



Dec 05, 2025

Version 1

Stx2 Subtypisierung V.1

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l6z5k5gqe/v1>

Emanuel Heitlinger¹, Bettina Welter¹, Nadja Walter¹, olivia.hollaender¹, Philipp Zanger¹

¹Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz



Emanuel Heitlinger

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l6z5k5gqe/v1>

Protocol Citation: Emanuel Heitlinger, Bettina Welter, Nadja Walter, olivia.hollaender, Philipp Zanger 2025. Stx2 Subtypisierung. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l6z5k5gqe/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **[Creative Commons Attribution License](#)**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working

Das Protokoll entspricht einer in unserem Haus validierten Prüfmethode, die wir in der Labor Routine seit 25.11. 2025 einsetzen.

Created: November 17, 2025

Last Modified: December 05, 2025

Protocol Integer ID: 232724

Keywords: EHEC, HUS, Shigatoxin, stx, stx2, stx2-subtyping, risk variants of stx2, relevant distinction from other stx2 variant, other stx2 variant, enterohemorrhagic escherichia coli, urämischen syndrom, 2c und 2d

Abstract

Nach §34 IfSG müssen in Deutschland Personen, die Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) ausscheiden, bis zum Ausschluss einer relevanten Infektionsgefahr von Gemeinschaftseinrichtungen ferngehalten werden. Die Wiedenzulassung orientiert sich an Empfehlungen des Robert Koch-Instituts (EHEC: Überarbeitung der RKI-Empfehlungen für die Wiedenzulassung zu Gemeinschaftseinrichtungen gemäß §34 IfSG nach EHEC-Infektion, Epid Bull 47/2019). Als Hochrisikovarianten für das Auftreten eines hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) gelten insbesondere die *stx2*-Subtypen **2a**, **2c** und **2d**.

Das hier vorgestellte Protokoll beschreibt einen real-time qPCR-Assay, der gezielt diese drei Hochrisikovarianten von *stx2* detektiert und damit eine diagnostisch relevante Abgrenzung zu anderen, mit geringerem HUS-Risiko assoziierten *stx2*-Varianten ermöglicht. Die Primer und Hydrolysesonden basieren auf Harada et al. (2023), wurden jedoch in einem kombinierten One-Tube-Format zusammengeführt. Dadurch wird das Assay für Anwendungen in der Wiedenzulassungspraxis erheblich vereinfacht. Der Ansatz kann jedoch in Einzelfällen zu eingeschränkter Differenzierbarkeit der Subvarianten führen.

Stx2 Subtyping

According to Section 34 of the German law for the prevention of infections (IfSG), persons in Germany who excrete enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) must be kept away from communal facilities until the relevant risk of infection has been ruled out. Readmission is based on recommendations from the Robert Koch Institute (EHEC: Revision of the RKI recommendations for readmission to community facilities in accordance with Section 34 IfSG after EHEC infection, Epid Bull 47/2019). The *stx2* subtypes 2a, 2c, and 2d are considered high-risk variants for the occurrence of hemolytic uremic syndrome (HUS).

The protocol presented here describes a real-time qPCR assay that specifically detects these three high-risk variants of *stx2*, thus enabling a diagnostically relevant distinction from other *stx2* variants associated with a lower risk of HUS. The primers and hydrolysis probes are based on Harada et al. (2023), but have been combined in a one-tube format. This greatly simplifies the assay for use in readmission practices. However, in individual cases, this approach may lead to limited differentiation between the subvariants.



Materials

⊗ TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) **Life Technologies Catalog #4304437**

⊗ TaqMan Exogenous Internal Positive Control **Life Technologies Catalog #4308323**

Protocol materials

⊗ TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) **Life Technologies Catalog #4304437**

⊗ TaqMan Exogenous Internal Positive Control **Life Technologies Catalog #4308323**

Probenvorbereitung

- 1  2 mL DNase-freies Aqua dest. in ein Reagenzglas pipettieren
- 2 Mit einem Bürstentupfer mehrere Kolonien von der MacConkey-Platte abnehmen
- 3 In Aqua dest. suspendieren und den Bürstentupfer am Reagenzglasrand ausdrücken
- 4 Vortexen und 1 ml in ein Reaktionsgefäß pipettieren
- 5 Gefäß fest verschließen und in den ThermoMixerC bei erreichter Temperatur von  95 °C einsetzen
- 6 Im Thermo-Mixer für 10 min bei  95 °C unter Schütteln erhitzen
- 7 Anschließend bei 12.000 rpm 1 min zentrifugieren

Herstellung des Master-Primer-Mix (Vorrat)

- 8 Vor der Verwendung sind alle Primer und Sonden schonend bei 2–8 °C aufzutauen.
- 9 Aliquotieren um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden.
- 10 Erstellen des Primer-Master-Mix aus den Aliquots nach folgendem Schema:

	A	B	C
	Vol in µl	Primer/Sonde*	Konz.
	80	Stx2a-Fwd	10µM

	A	B	C
	80	Stx2a-Rwd	10µM
	40*	stx2aFAM-Probe	10µM
	80	Stx2c-Fwd	10µM
	80	Stx2c-Rwd	10µM
	80	stx2cCyanin-Probe	10µM
	80	Stx2d-Fwd	10µM
	80	Stx2d-Rwd	10µM
	80	stx2dABY-AGT-Probe	10µM

*Wir setzen die Sonde für stx2a in halber Konzentration relativ zu anderen Sonden ein, um Unterschiede in der Signalstärke auszugleichen.

Sequenzen von Primern und Sonden - Assay Setup (Design als „Thermo Fisher Custom TaqMan Probes“ online)

stx2a:

Stx2a-Fwd

GGCGGATTGTGCTAAAGGTA

Stx2a-Rwd

GTTGCAGATTCCAGCGACT

Stx2aFAM-Probe

[FAM]AGGATGACACATTTACAGTGAAGGTTG[MGBEQ]

stx2c:

Stx2c-Fwd

CAGCGTTTCTGAACAGAAAGTC

Stx2c-Rwd

CTTTTACTGTGAATGTATCATTCTCATTATAC

Stx2cCyanin-Probe

[Cy5]ACAGTTTTTATATACAACGGGTAAA[QSY2]

stx2d:

Stx2d-Fwd

TATGGGAAAGTAATACAGCAGCAG

Stx2d-Rwd

CCGCCATAAACATCTTCTTCATAC

Stx2dABY-AGT-Probe

[ABY]AGTCTTTATATACAACGGGTGAATA[QSY]

- 11 Vor Gebrauch alle Reagenzien gut mischen und kurz zentrifugieren. Vor der Verwendung wieder schonend bei 2–8 °C auftauen.

Herstellung des Mastermix

- 12 Die Anzahl der für die PCR benötigten Reaktionen ergibt sich aus der Zahl der Proben sowie einer negativen Kontrolle, einer positiven Kontrolle.

- 13 Wir nutzen als interne Amplifikationskontrolle Kontrolle



TaqMan Exogenous Internal Positive Control **Life Technologies Catalog #4308323**

mit dem VIC Fluorophor.

- 14 Die **einzelnen** Reaktionen setzen sich wie folgt zusammen:

	A	B
	Vol. in µl	
	10	2x Univ. PCR MMX
	2,2	10x Exo IPC Mix
	0,5	50x Exo IPC DNA
	4,25	Primer Mix
	2,05	A.dest

Mischverhältnisse im Mastermix für eine **Einzelprobe**

- 15 Mastermix: In der Berechnung für mehrere Proben Pipettierverluste ausgleichen (eine zusätzliche Reaktion annehmen)!

Herstellung des PCR-Mix

- 16 Je 19 µl des Master-Mix in jede benötigte Vertiefung der PCR-Platte pipettieren



- 17 Proben zum Master-Mix pipettieren:
- Negativkontrolle: 1 µl Aqua dest.
 - Positivkontrolle: 1 µl Positive Control (Mix aus Proben von Referenzstämmen, die Stx2a, 2c, und 2d positiv sind)
 - Proben: 1 µl der extrahierten Probe

PCR Programm

18

	A	B	C	D	E
	Pre-Read-Stabilisierung/UNG-Aktivierung	50	2 Minuten	1	Messung der Grundfluoreszenz und Temperaturstabilisierung, UNG Aktivierung
	Initiale Denaturierung	95	10 Minuten	1	Aktivierung der Taq-Polymerase und Denaturierung der DNA
	Denaturierung	95	15 Sekunden	40	Trennung der DNA-Stränge
	Annealing und Elongation	60	60 Sekunden	40	Primerbindung und DNA-Synthese durch Polymerase
	Endgültige Elongation	60	5 Minuten	1	Sicherstellung vollständiger Amplifikation

Temperaturprofil für die Hausmethode zur Subtypisierung stx2-pos. EHEC.

- 19 Die Amplifikation erfolgt im Quantstudio Pro 6 Thermal Cycler.



Für andere Labore: Bei der Verwendung eines anderen Systems ist darauf zu achten, dass die VIC, FAM, Cy5 und ABY Kanäle getrennt werden können.

Auswertung

20

	A	B	C	D	E	F
	stx 2a	stx 2c	stx 2d	ICD *	Ergebnisdet ail (intern)**	Ergebnis (Befund)** *
	po siti v	ne gat iv	ne ga tiv	posi tiv / neg ativ	Hochrisikov ariante (stx2a) nachweisba r	Hochrisikov ariante (Stx2a, 2c oder 2d) positiv
	po siti v	po siti v	ne ga tiv	posi tiv / neg ativ	Hochrisikov ariante (stx2a oder [stx2a und 2c]) nachweisba r	Hochrisikov ariante (Stx2a, 2c oder 2d) positiv
	ne gat iv	po siti v	ne ga tiv	posi tiv / neg ativ	Hochrisikov ariante (stx2c) nachweisba r	Hochrisikov ariante (Stx2a, 2c oder 2d) positiv
	ne gat iv	ne gat iv	po siti v	posi tiv / neg ativ	Hochrisikov ariante (Stx2d) nachweisba r	Hochrisikov ariante (Stx2a, 2c oder 2d) positiv
	po siti v	po siti v	po siti v	posi tiv / neg ativ	Hochrisikov arianten ([stx2a und 2d] oder [stx2a, 2c und 2d]) nachweisba r	Hochrisikov ariante (Stx2a, 2c oder 2d) positiv
	ne gat iv	po siti v	po siti v	posi tiv / neg ativ	Hochrisikov arianten (stx2c und 2d) nachweisba r	Hochrisikov ariante (Stx2a, 2c oder 2d) positiv

	A	B	C	D	E	F
	ne gat iv	ne gat iv	ne ga tiv	posi tiv	Hochrisikov arianten (Stx2a, 2c, 2d) nicht nachweisba r	Hochrisikov ariante (Stx2a, 2c oder 2d) nicht nachweisba r
	ne gat iv	ne gat iv	ne ga tiv	neg ativ	ungültig	Nicht möglich**

* Bei positiven Proben können negative interne Kontrollen toleriert werden. Starke positive Signale können die ICR überstrahlen.

** Die Methode detektiert die drei Hochrisikovarianten 2a, 2c und 2d des Stx2 Virulenzfaktor zuverlässig in klarer Abgrenzung zu anderen Varianten mit niedrigerem Risiko. Die Methode unterscheidet allerdings nicht in allen Fällen zwischen Stx2a und 2c.

*** Eine Testung ist ungültig, wenn sowohl die Probe-DNA als auch die Internal Control DNA keine Amplifikation Nachweissystem zeigen. In der Probe sind ggf. PCR-Inhibitoren vorhanden. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Lyse und Reinigung der Probe wiederholt werden. Falls die Amplifikation wiederholt fehlschlägt wird die Probe mit dem Befund "Nicht möglich" freigegeben.

Befundkommentar

- 21 Zur Information der Gesundheitsämter nutzen wir folgenden Kommentar:
„Die stx2-Subtypisierung detektiert die drei Hochrisikovarianten 2a, 2c und 2d des Shigatoxin-Gens stx in Abgrenzung zu anderen Varianten mit niedrigerem Risiko von HUS (siehe EHEC: Überarbeitung der RKI-Empfehlungen für die Wiedezulassung zu Gemeinschaftseinrichtungen gemäß § 34 IfSG nach EHEC-Infektion, Epid Bull 47/2019)“.

Protocol references

Harada, T., Wakabayashi, Y., Seto, K., Lee, K., Iyoda, S., & Kawatsu, K. (2023). Real-time PCR assays to detect 10 Shiga toxin subtype (Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, and Stx2g) genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 105(3), 115874.

EHEC: Überarbeitung der RKI-Empfehlungen für die Wiedezulassung zu Gemeinschaftseinrichtungen gemäß § 34 IfSG nach EHEC-Infektion, Epid Bull 47/2019