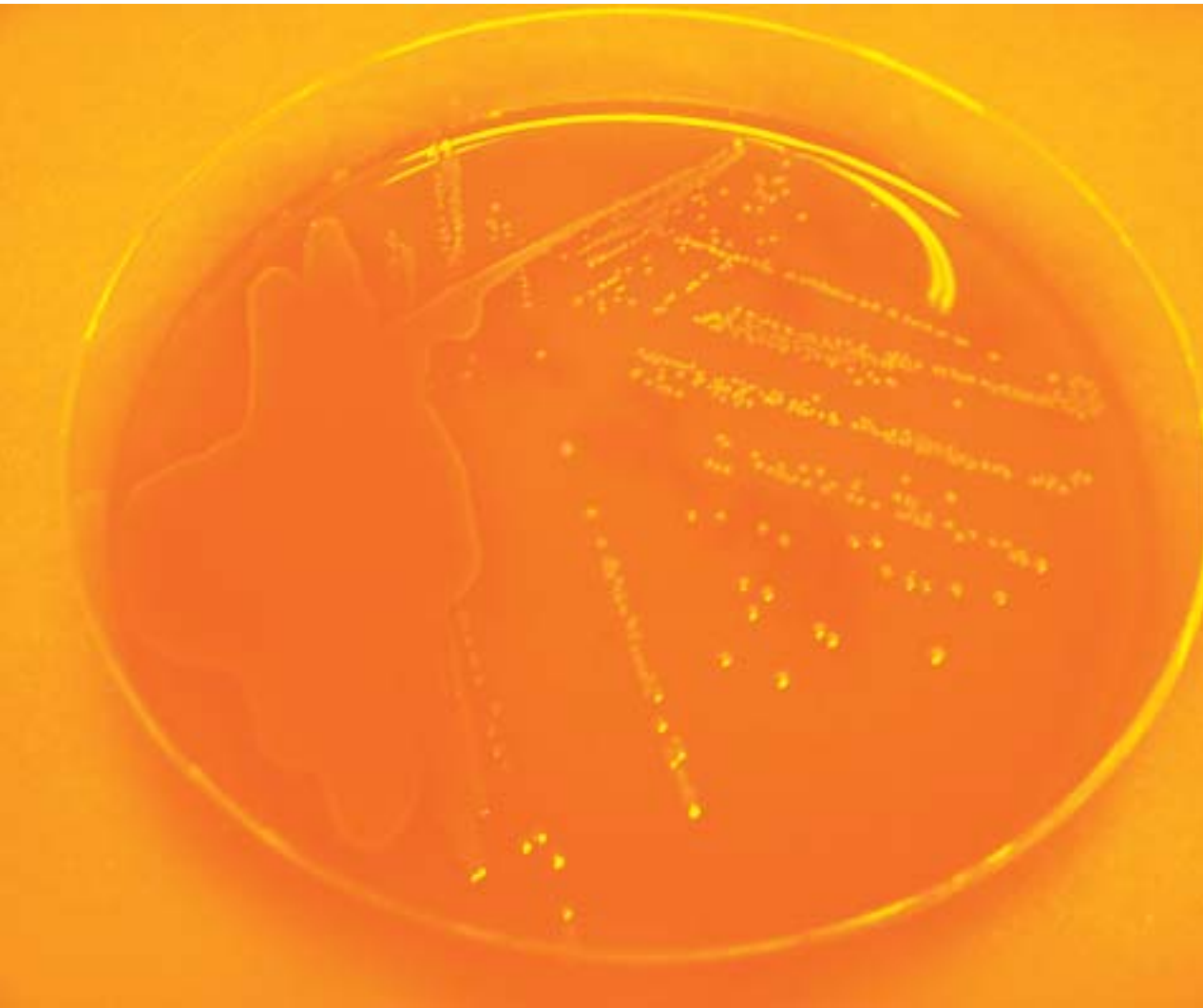




II. EHEC-Workshop 2007

der Fachgruppen

„Gastrointestinale Infektionen“ und „Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene“
der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM),

„Bakteriologie und Mykologie“
der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft,

des Österreichischen Referenzzentrums für EHEC, Innsbruck,

des Nationalen Zentrums für enteropathogene Bakterien (NENT), Luzern

und

der Akademie
für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43
91058 Erlangen

Telefon: 09131/764-0
Telefax: 09131/764-102

E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

Redaktion:

Dr. med. Susanne Kübert, Akademie für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz
Dr. Ulrich Busch, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Dr. Gerlinde Bellof, Akademie für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz

Layout:

Stefanie Lötsch, Dr. med. Susanne Kübert
Akademie für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. med. Susanne Kübert
Tel.: 089/2184-230
E-Mail: susanne.kuebert@lgl.bayern.de

Dr. Ulrich Busch
Tel.: 089/31560-234
E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

Stand:

April 2007

ISBN 978-3-939652-25-0 (Print Version)
ISBN 978-3-939652-26-7 (Online Version)

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung – auch von Teilen – unter Angabe der Quelle wird um Übersendung eines Belegexemplars erbeten. Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Publikation wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden.

Inhaltsverzeichnis

Grußworte	3
Herr Dr. Werner Schnappauf	3
Herr Prof. Dr. Volker Hingst	5
Tagungsprogramm	7
Mittwoch, 9. Mai 2007	7
Donnerstag, 10. Mai 2007	7
Freitag, 11. Mai 2007	9
Einführung, Vorwort	10
Abstracts	12
A. Epidemiologie	13
I. Epidemiologie von EHEC-Gastroenteritis und EHEC-assoziiertem hämolytisch urämischem Syndrom in Deutschland – Analyse der Meldedaten 2001-2005	14
II. Kohortenstudie zu sekundären Haushaltsübertragungen Shigatoxin produzierender Escherichia coli der Serogruppe O157 – eine Möglichkeit zur Intervention?	15
III. Intensivierte Surveillance des hämolytisch-urämischen Syndroms in Bayern – Ergebnisse des Jahres 2006	16
IV. HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische E. coli O157:H- in Norddeutschland im Frühjahr / Sommer 2006	18
V. Untersuchung eines EHEC-Ausbruchs mit 59 Fällen nach einem Ferienlager mit Rohmilchverzehr durch eine retrospektive Kohortenstudie	19
VI. Epidemiologie des EHEC assoziierten HUS	20
VII. Phylogenetische Analysen enterohämorrhagischer E. coli von HUS-Patienten	21
VIII. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro is the determinant factor in the appearance of the haemolytic uraemic syndrome	22
B. EHEC und Lebensmittel / Nachweisverfahren und Diagnostik	23
I. Is it time for a new standard in Escherichia coli serotyping?	24
II. Eigenschaften von Shiga (Vero) Toxin bildenden E. coli aus Lebensmitteln in Deutschland, Konsequenzen für den Verbraucherschutz	25
III. Nachweis von Shiga Toxin bildenden Escherichia coli (STEC) im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung in Bayern (2003 - 2006)	27
C. EHEC-Reservoir Tier	28
I. Finished pigs – an animal reservoir for O157 and non-O157 STEC	29
II. Untersuchungen zum Einfluss des Shigatoxin-Antikörpertiters auf die STEC- Ausscheidung bei Kälbern	30
III. Rinderdichte – Ein Risikofaktor für viele, aber nicht alle Serogruppen Shigatoxin produzierender Escherichia coli in Deutschland	31
D. Andere E. coli Pathovare	32
I. The inhibitory effect of E. coli Nissle 1917 on EPEC infection in a porcine in vitro model is mediated by its adherence via F1C fimbria	33
II. Nachweis, Virulenzfaktoren und Typen enteroaggregativer Escherichia coli	34
III. Genomvariabilität, Evolution und Pathogenese extraintestinal pathogener Escherichia coli (ExPEC)	35
E. Pathogenitätsfaktoren	36
I. Vergleich der Genomstrukturen von EHEC	37
II. Interaction of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) pathogenicity factors with the human complement system – Evidence for a pathogenic role of complement in EHEC-induced haemolytic uraemic syndrome	38
III. Charakterisierung der NleA-Familie von Typ III Effektoren bei verschiedenen Serogruppen pathogener Escherichia coli	39

F.	Wirt-Erreger-Interaktionen	40
I.	Glykosphingolipide vaskulärer Endothelzellen: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren	41
II.	Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen	42
Poster.....		44
I.	Bedeutung von Sorbit-fermentierenden <i>E. coli</i> O157:H- als Krankheitserreger.....	47
II.	Untersuchungen zu räumlichen und zeitlichen Zusammenhängen von potentiellen EHEC des Serovars O26:H11 isoliert in deutschen Rinderbeständen	48
III.	Evaluierung des RIDASCREEN® Enzym-Immunoassays zum Nachweis von Shiga (Vero) Toxin bildenden <i>Escherichia coli</i> Stämmen verschiedener Herkunft.	49
IV.	Subtypisierung von Shiga Toxin produzierenden STEC mittels Schmelzkurvenanalyse	50
V.	Untersuchung von EHECs aus humanen Stuhlproben auf das Vorhandensein des für ein neuartiges Zytotoxin kodierenden <i>subAB</i> Gens.....	51
VI.	Use of DNA microarrays for the detection and characterisation of pathogens: Development of a microarray for the analysis of virulence and virulence associated genes in STEC/VTEC	52
VII.	Reaktivität von Stx1, Stx2 und deren Varianten mit monoklonalen Antikörpern	53
VIII.	"Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT" von INSTAND e.V.: Externe Qualitätskontrolle in der molekularbiologischen EHEC-Diagnostik.....	54
IX.	Untersuchung von humanen Stuhlproben und Umgebungsproben auf EHEC im Jahr 2006 in Bayern.....	55
X.	Entwicklung einer hochsensitiven Immuno-PCR zum Nachweis von Shiga Toxinen ...	56
XI.	Prevalence of STEC in Swiss raw milk cheeses collected at retail level	57
XII.	Virulenz- und Fitnessgene bei Stx2e-bildenden <i>Escherichia coli</i> aus Schweinen in Deutschland	58
XIII.	Verbreitung shigatoxinogener <i>Escherichia coli</i> in Milchviehbetrieben Schleswig-Holsteins	59
XIV.	Identifizierung mesenchymaler Zellen aus bovinen Kolonkrypten als Zielzellen für Shigatoxin 1 von <i>Escherichia coli</i>	60
XV.	Shiga toxin Stx2d ^{activatable} in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter	61
XVI.	Fallbericht: Eine Hauskatze als Ausscheider von EHEC	62
XVII.	Prevalence of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> in dairy calves	63
XVIII.	Prävalenz von enteropathogenen <i>Escherichia coli</i> (EPEC) in Lebensmitteln.....	64
XIX.	Occurrence of "pathoadaptive mutations" in the <i>cadBA</i> operon in several intestinal <i>E. coli</i>	65
XX.	Virulenzfaktoren enteroaggregativer <i>E. coli</i> (EAEC) aus humanen Isolaten	66
XXI.	Untersuchung von humanen Stuhlproben und Lebensmittelproben auf verschiedene Pathovaren (EHEC, ETEC, EIEC) von <i>Escherichia coli</i> in Bayern	67
XXII.	Phänotypische und genotypische Charakterisierung von enterohämorrhagischen <i>Escherichia coli</i> O26	68
XXIII.	Proteinchemische und molekularbiologische Charakterisierung der Serinprotease EspP	69
XXIV.	Dünnschichtchromatografische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen.....	70
XXV.	Etablierung eines Bakterien-Adhäsionstests zur strukturellen Charakterisierung von <i>E. coli</i> -bindenden Glykosphingolipiden mittels Massenspektrometrie	71
XXVI.	Transcriptional regulation of the adherence/lymphocyte inhibitory factor <i>efa1/lifA</i> gene of an enterohemorrhagic <i>E. coli</i> strain	68
XXVII.	In vitro effect of release/production of Shiga toxin (Stx) by different serogroups of VTEC following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents	73
XXVIII.	Langzeitausscheider von EHEC – Probleme und Konsequenzen.....	74
XXIX.	Charakterisierung NleA-kodierender Bakteriophagen von enterohämorrhagischen <i>Escherichia coli</i> (EHEC).....	75
Referentenverzeichnis		76

Grußworte

*Grußwort des
Bayerischen Staatsministers für
Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz*

Herr Dr. Werner Schnappauf

Willkommen zum 2. EHEC-Workshop 2007 in Wildbad Kreuth!

Ein besonderer Gruß gilt den Teilnehmerinnen und Teilnehmern aus dem öffentlichen Gesundheitsdienst, der Wissenschaft und Industrie sowie unseren Gästen aus Österreich und der Schweiz. Ich freue mich, dass sich über die Ländergrenzen hinweg so gute und freundschaftliche Kontakte entwickelt haben.

Mit dem diesjährigen EHEC-Workshop wird einem wichtigen und aktuellen Bereich des weit gefächerten Aufgabengebietes des öffentlichen Gesundheitsdienstes und der Wissenschaft Rechnung getragen.

Gerade im Bereich Infektionsschutz ist es von großer medizinischer Relevanz, fachlich stets bestens auf neue Herausforderungen vorbereitet zu sein, um Empfehlungen für die Prävention zu erarbeiten, um die nach § 6 Infektionsschutzgesetz (IfSG) durchzuführenden Ermittlungen der lokalen Gesundheitsbehörde zielgerichtet gestalten zu können oder um Risikofaktoren zu bestätigen oder neu zu identifizieren.

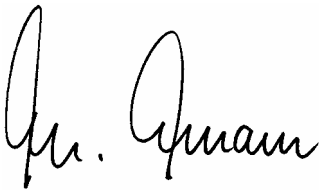
Daher ist es unerlässlich die eigene Fachkompetenz im Austausch zu erhalten und weiter auszubauen. Dazu sind eine kontinuierliche fachliche Fortbildung und ein übergreifender Austausch fachspezifischer Erfahrungen unverzichtbar.

Ich freue mich daher sehr, dass der diesjährige EHEC-Workshop mit den vorgesehenen Vorträgen, Posterausstellungen und Diskussionen wie auch schon im Jahre 2004 erneut ein exzellentes Forum für den interdisziplinären Gedankenaustausch bietet und Ihnen die Möglichkeit gibt, sich über den aktuellen Stand der Wissenschaft und zahlreiche aktuelle Projekte zu informieren.

Im Bildungszentrum Wildbad Kreuth der Hanns-Seidel-Stiftung heiße ich Sie herzlich willkommen. Lassen Sie sich von der Kulisse und Atmosphäre von Wildbad Kreuth anregen und genießen Sie die bekannte bayerische Gastfreundschaft.

Ich danke unseren Mitarbeitern, die sich bei der Organisation und Vorbereitung der Tagung außerordentlich engagiert haben. Der Veranstaltung wünsche ich einen guten Verlauf und Ihnen eine fachlich interessante, erfolgreiche und angenehme Tagung sowie fruchtbare Gespräche.

Es grüßt Sie ganz herzlich,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dr. Schnappauf'.

Dr. Werner Schnappauf
Staatsminister

*Grußwort des
Präsidenten des Bayerischen Landesamts
für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit*

Herr Prof. Dr. Volker Hingst

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

ein herzliches Grüß Gott beim 2. EHEC-Workshop 2007.

Hier im schönen Wildbad Kreuth darf es gesagt werden: nur wenige Bakterien haben eine so „bayerische“ Geschichte wie *Escherichia coli*. Diese Bakterien-Spezies wurde nicht nur nach einem Landekind benannt, dessen Geburt in Ansbach sich heuer zum 150. Mal jährt. Vielmehr ist *Escherichia coli* gleichsam selbst ein Landekind, wurde dieses Bakterium doch erstmals in München, genauer im damaligen Pathologischen Institut der Universität München an der Ecke Schiller-/Nussbaumstraße im Jahre 1885 aus dem Stuhl von Säuglingen isoliert. Escherich, der damals als Pädriater am von Hauner'schen Kinderspital in München tätig war und für seine bakteriologischen Studien auf das Labor des Lehrstuhlinhabers für Pathologie Otto von Bollinger zurückgreifen konnte, beschrieb in seiner Abhandlung „Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung“ von 1886 die von ihm entdeckten Bakterien als „*Bacterium coli commune*“, da er sie als die beim Menschen am häufigsten anzutreffenden Darmbakterien betrachtete. Mittlerweile gilt *Escherichia coli* als der am besten charakterisierte Organismus der Erde, doch nicht nur der EHEC-Workshop 2007 wird zeigen, dass auch bei *Escherichia coli* immer wieder neue Entdeckungen zu machen sind.

Theodor Escherich hätte es sich wohl nicht träumen lassen, dass „sein“ Bakterium nicht nur zum Wegbereiter für die Gentechnologie werden würde, sondern auch derartig vielgestaltig und also gar nicht so „commune“ ist, dass die unterschiedlichen Pathotypen nur noch durch ein immer weiter ausuferndes Heer von Akronymen begrifflich gefasst werden können. Dem trägt auch die diesjährige Tagung Rechnung, die hoffentlich einiges Licht in die Bedeutung von EHEC, ETEC, EIEC, EPEC, EAEC, DAEC, ExPEC, UPEC, MNEC, SePEC, VTEC, STEC und wie sie alle heißen mögen bringen wird.

Angesichts der ländlichen Umgebung des nun schon traditionellen EHEC-Workshops sei auch an eine weitere bayerische Facette dieses Mikroorganismus in seiner Ausprägung als EHEC erinnert, wurde doch nach dem Auftreten einer ungewöhnlichen Häufung von schweren EHEC-Infektionen mit HUS-Symptomatik 1996 eine bayernweite Meldepflicht eingeführt. Dieser folgte 1999 eine bundesweite Meldepflicht. Zunehmend wurde nach der Erstbeschreibung von EHEC im Jahre 1983 erkannt, dass es sich bei EHEC-Bakterien um Mikroorganismen handelt, die als wichtigstes Reservoir landwirtschaftliche Nutztiere haben und so über Lebensmittel tierischen Ursprungs, aber auch über kontaminierte Lebensmittel oder Trinkwasser auf den Menschen übertragen werden können. Die enteropathogenen *E. coli* stellen also ein entsprechend umfangreiches Arbeitsfeld dar, das sich in der interdisziplinären Zusammensetzung auch dieses Workshops mit Kolleginnen und Kollegen aus der Human- und Veterinärmedizin, der Biologie und der Umwelthygiene widerspiegelt.

Zum Abschluss sei der Hoffnung Ausdruck verliehen, dass durch die gemeinsamen Anstrengungen aller in die „EHEC-ologie“ involvierten Fachdisziplinen ähnlich desaströse Ausbrüche wie die „Walkerton Tragedy“ in Ontario/Kanada, für deren über 2000 durch EHEC-kontaminiertes Trinkwasser infizierte Opfer sogar eine eigene Gedenkstätte errichtet wurde, verhindert werden können. Mögen also weiterhin die in zahlreichen Städten Bayerns zu findenden Pestsäulen die einzigen an Bakterien erinnernden Baudenkmäler bleiben.

In diesem Sinne wünsche ich allen Teilnehmern eine erfolgreiche und angenehme Tagung in dieser bayerischen Umgebung. Allen Mitarbeitern, die an der Vorbereitung und Organisation des Workshops beteiligt sind, sowie Herrn Kollegen Sing zu dem für die historischen Hinweise in diesem Grußwort, gilt mein besonderer Dank.

Es grüßt Sie ganz herzlich,



Prof. Dr. Volker Hingst

*Präsident des Bayerischen Landesamts
für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit*

Tagungsprogramm

Mittwoch, 9. Mai 2007

ab 18.⁰⁰

Begrüßung

N. N., StMUGV; V. Hingst, Präsident LGL

19.⁰⁰ - 20.⁰⁰

Festvortrag: Molekulare Epidemiologie von *E. coli* Infektionen

L. Wieler, Berlin

Donnerstag, 10. Mai 2007

Epidemiologie

Vorsitz: M. Wildner, L. B. Zimmerhackl

9.⁰⁰ - 9.²⁰

Epidemiologie von EHEC-Gastroenteritis und EHEC-assoziiertem hämolytisch urämischem Syndrom in Deutschland – Analyse der Meldedaten 2001 - 2005

Ch. Frank et al., Berlin

9.²⁰ - 9.⁴⁰

Kohortenstudie zu sekundären Haushaltsübertragungen Shigatoxin produzierender *E. coli* der Serogruppe O157 – eine Möglichkeit zur Intervention?

D. Werber et al., Berlin

9.⁴⁰ - 10.⁰⁰

Intensivierte Surveillance des hämolytisch-urämisches Syndroms in Bayern – Ergebnisse des Jahres 2006

A. Heißenhuber et al., Oberschleißheim

10.⁰⁰ - 10.²⁰

HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische *E. coli* O157:H- in Norddeutschland im Frühjahr / Sommer 2006

A. Fruth et al., Wernigerode

10.²⁰ - 10.⁴⁰

Untersuchung eines EHEC-Ausbruchs mit 59 Fällen nach einem Ferienlager mit Rohmilchverzehr durch eine retrospektive Kohortenstudie

J. Dressmann et al., Hannover

10.⁴⁰ - 11.⁰⁰

Diskussion

11.⁰⁰ - 11.³⁰

Kaffeepause

Vorsitz:

H. Karch, R. Würzner

11.³⁰ - 11.⁵⁰

Epidemiologie des EHEC assoziierten HUS

L. B. Zimmerhackl et al., Innsbruck

11.⁵⁰ - 12.¹⁰

Phylogenetische Analysen enterohämorrhagischer *E. coli* von HUS-Patienten

A. Mellmann et al., Münster

12.¹⁰ - 12.³⁰

The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro is the determinant factor in the appearance of the haemolytic uraemic syndrome

D. Orth et al., Innsbruck

12.³⁰ - 12.⁴⁵

Diskussion

12.⁴⁵ - 14.⁰⁰

Mittagspause

Donnerstag, 10. Mai 2007

EHEC und Lebensmittel / Nachweisverfahren und Diagnostik

Vorsitz: R. Bauerfeind, U. Busch

14.⁰⁰ - 14.³⁰ **Is it time for a new standard in Escherichia coli serotyping?**

H. Hächler et al., Bern

14.³⁰ - 15.⁰⁰ **Eigenschaften von Shiga (Vero) Toxin bildenden E. coli aus Lebensmitteln in Deutschland, Konsequenzen für den Verbraucherschutz**

L. Beutin et al., Berlin

15.⁰⁰ - 15.¹⁵ **Nachweis von Shiga Toxin bildenden Escheria coli (STEC) Eigenschaften von Shiga (Vero) Toxin bildenden E. coli aus Lebensmitteln**

U. Messelhäußer et al., Oberschleißheim

15.¹⁵ - 15.³⁰ **Postervorstellung und Diskussion**

15.³⁰ - 16.⁰⁰ **Kaffeepause**

EHEC-Reservoir Tier

Vorsitz: G. Baljer, L. Beutin

16.⁰⁰ - 16.²⁰ **Finished pigs – an animal reservoir for O157 and non-O157 STEC**

R. Stephan et al., Zürich

16.²⁰ - 16.⁴⁰ **Untersuchungen zum Einfluss des Shigatoxin-Antikörpertiters auf die STEC-Ausscheidung bei Kälbern**

Ch. Menge et al., Gießen

16.⁴⁰ - 17.⁰⁰ **Rinderdichte – Ein Risikofaktor für viele, aber nicht alle Serogruppen Shigatoxin produzierender Escherichia coli in Deutschland**

K. Stark et al., Berlin

17.⁰⁰ - 17.¹⁵ **Postervorstellung und Diskussion**

17.¹⁵ - 17.³⁰ **Verleihung der Posterpreise**

ab 18.⁴⁵ **Abendveranstaltung**

Freitag, 11. Mai 2007**Andere E. coli Pathovare**

- Vorsitz:** A. Fruth, H. Hächler
- 8.³⁰ - 8.⁵⁰ **The inhibitory effect of *E. coli* Nissle 1917 on EPEC infection in a porcine in vitro model is mediated by its adherence via F1C fimbria**
P. Schierack et al., Berlin
- 8.⁵⁰ - 9.¹⁰ **Nachweis, Virulenzfaktoren und Typen enteroaggregativer E. coli**
A. Lehmacher et al., Hamburg
- 9.¹⁰ - 9.³⁰ **Genomvariabilität, Evolution und Pathogenese extraintestinal pathogener Escherichia coli (ExPEC)**
S. Schubert et al., München
- 9.³⁰ - 9.⁴⁵ **Postervorstellung und Diskussion**
- 9.⁴⁵ - 10.¹⁵ **Kaffeepause**

Pathogenitätsfaktoren

- Vorsitz:** H. Schmidt, A. Friedrich
- 10.¹⁵ - 10.⁴⁰ **Vergleich der Genomstrukturen von EHEC**
H. Karch et al., Münster
- 10.⁴⁰ - 11.⁰⁰ **Interaction of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) pathogenicity factors with the human complement system – Evidence for a pathogenic role of complement in EHEC induced haemolytic uraemic syndrome**
R. Würzner et al., Innsbruck
- 11.⁰⁰ - 11.²⁰ **Charakterisierung der NleA-Familie von Typ III Effektoren bei verschiedenen Serogruppen pathogener Escherichia coli**
K. Creuzburg et al., Stuttgart
- 11.²⁰ - 11.⁵⁰ **Postervorstellung und Diskussion**

Wirt-Erreger Interaktionen

- Vorsitz:** R. Stephan, L. Wieler
- 11.⁵⁰ - 12.¹⁰ **Glykosphingolipide vaskulärer Endothelzellen: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren**
J. Müthing et al., Münster
- 12.¹⁰ - 12.³⁰ **Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen**
C. Schweppe et al., Münster
- 12.³⁰ - 12.⁵⁰ **Postervorstellung und Diskussion**
- 12.⁵⁰ - 13.⁰⁰ **Abschluss der Tagung**
- 13.⁰⁰ - 14.⁰⁰ **Mittagessen**

Einführung, Vorwort

Dr. Ulrich Busch

Anknüpfend an den 1. EHEC-Workshop 2004 in Wildbad Kreuth möchte auch der 2. EHEC-Workshop wieder als interdisziplinäre Plattform für Wissenschaft, Behörde und Industrie dienen, um über Risikofaktoren, die gesundheitlichen Folgen und die Auswirkungen der EHEC-Infektionen zu diskutieren und neue wissenschaftliche Erkenntnisse auszutauschen. Das umfangreiche Programm mit den unterschiedlichen Themenbereichen, die sich von Epidemiologie, über Nachweisverfahren und Diagnostik, Lebensmittel, EHEC Reservoir Tier und Umwelt, Pathogenitätsfaktoren und Genomics bis zur Wirt-Erreger-Interaktion erstrecken, zeigt deutlich die Aktualität des Themas und stellt die Voraussetzung für den wissenschaftlichen Dialog dar. Um den Bezug zu weiteren Pathovaren von *E. coli* aufzuzeigen, wurde eine eigene Veranstaltung „Andere *E. coli* Pathovare“ ins Programm genommen, die den Bogen von EHEC zu EPEC und enteroaggregativen *E. coli* aufzeigen soll.

Der Workshop wird von der Akademie für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz (AGEV) im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), gemeinsam mit den Fachgruppen „Gastrointestinale Infektionen“ und „Lebensmittelmikrobiologie“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie sowie der Fachgesellschaft „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), dem Österreichischen Referenzzentrum für EHEC, Innsbruck und dem Schweizer Nationalen Zentrum für enteropathogene Bakterien (NENT) in Luzern, veranstaltet.

Besonders die Beteiligung aller nationalen Referenzzentren aus Deutschland mit dem Nationalen Referenzlabor für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger des RKI in Wernigerode, dem Nationalen Referenzlabor für *Escherichia coli* des BfR, dem Konsiliarlabor für HUS der Universität Münster, dem Referenzzentrum für EHEC aus Innsbruck und dem Zentrum für enteropathogene Bakterien in Luzern zeigen eindrucksvoll die wissenschaftliche Bedeutung des Workshops. Die Teilnahme dieser Speziallaboratorien soll als Grundlage für einen intensiven wissenschaftlichen Dialog über Ländergrenzen hinweg dienen und Basis für weitere gute Zusammenarbeit zwischen den beteiligten Medizinern, Veterinärmedizinern, Biologen und Biochemikern sein.

Die Vorträge und auch besonders die Posterbeiträge zeigen eine breite thematische Übersicht und die besonderen Details der Mikrobiologie von enterohämorrhagischen *E. coli*. Um die Bedeutung der Posterbeiträge für die Tagung entsprechend zu würdigen, werden die Posterbeiträge nach Auswahl durch die jeweiligen Moderatoren zu jeder Einheit in einer kurzen Übersicht vorgestellt. Weiterhin ist geplant, die drei besten Poster im Rahmen einer Posterpräsentation zu prämiieren. Die Preise setzen sich aus einer Urkunde und einem Sachpreis zusammen.

Der Workshop dient nicht nur dazu, sich mit Kolleginnen und Kollegen über die faszinierenden Details der EHEC-Bakterien auszutauschen, sondern auch Kontakte auszubauen, zu pflegen und zu vertiefen. Dazu besteht am wunderschönen Veranstaltungsort in Wildbad Kreuth ausreichend Gelegenheit

Eine solche Veranstaltung ist nicht möglich, ohne die zahlreichen helfenden Hände und Köpfe im Hintergrund, ganz besonders möchte ich mich bei der Akademie für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz (AGEV), bei Frau Dr. Kübert und Frau Lötsch bedanken, die sich in außerordentlichem Engagement um die Vorbereitung und Durchführung der Tagung engagiert haben. Weiterhin geht mein Dank an die Mitarbeiterinnen des EHEC-Labors am LGL, Frau Meindl, Frau Wolf und Frau Fräßdorf, die durch ihre tägliche Arbeit bei der EHEC-Diagnostik die Grundlage für die wissenschaftlichen Daten legen.

Ich wünsche allen eine spannende und erkenntnisreiche Tagung in Wildbad Kreuth und bin mir sicher, dass die Inhalte der Vorträge und Poster auch noch abends in geselliger Runde intensiv diskutiert werden und so Basis für eine intensive, länderübergreifende Zusammenarbeit sein werden, die dann in den 3. EHEC-Workshop 2010 münden können.



Abstracts

A. Epidemiologie

- I. **Epidemiologie von EHEC-Gastroenteritis und EHEC-assoziiertem hämolytisch urämischem Syndrom in Deutschland – Analyse der Meldedaten 2001 - 2005**
Ch. Frank et al., Berlin
- II. **Kohortenstudie zu sekundären Haushaltsübertragungen Shigatoxin produzierender E. coli der Serogruppe O157 – eine Möglichkeit zur Intervention**
D. Werber et al., Berlin
- III. **Intensivierte Surveillance des hämolytisch-urämischen Syndroms in Bayern – Ergebnisse des Jahres 2006**
A. Heißenhuber et al., Oberschleißheim
- IV. **HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische E. coli O157:H- in Norddeutschland im Frühjahr / Sommer 2006**
A. Fruth et al., Wernigerode
- V. **Untersuchung eines EHEC-Ausbruchs mit 59 Fällen nach einem Ferienlager mit Rohmilchverzehr durch eine retrospektive Kohortenstudie**
J. Dressmann et al., Hannover
- VI. **Epidemiologie des EHEC assoziierten HUS**
L. B. Zimmerhackl et al., Innsbruck
- VII. **Phylogenetische Analysen enterohämorrhagischer E. coli von HUS-Patienten**
A. Mellmann et al., Münster
- VIII. **The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro is the determinant factor in the appearance of the haemolytic uraemic syndrome**
D. Orth et al., Innsbruck

I. Epidemiologie von EHEC-Gastroenteritis und EHEC-assoziiertem hämolytisch urämischem Syndrom in Deutschland – Analyse der Meldedaten 2001-2005

Christina Frank, Dirk Werber

Abteilung für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut, Seestraße 10, 13353 Berlin,
FrankC@RKI.de

Schlüsselwörter: EHEC, HUS, Serogruppen, Altersverteilung, Saisonalität

Einführung: Die gesetzliche Meldepflicht gemäß IfSG umfasst seit 2001 alle Formen der symptomatischen Infektion mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) von Gastroenteritis bis zum lebensbedrohlichen hämolytisch urämischem Syndrom (HUS), sowie alle klinischen HUS, auch ohne Erregernachweis.

Methoden: Die Meldedaten der Kategorien EHEC und HUS 2001 bis 2005 wurden u. a. hinsichtlich Alters- und Geschlechterverteilung und Serogruppe ausgewertet.

Ergebnisse: In der Kategorie EHEC wurden 5303 Fälle übermittelt (926-1161 pro Jahr). Während das Geschlechterverhältnis insgesamt ausgeglichen ist, waren in der Gruppe unter 5 Jahren (50,2% aller Fälle) Jungen (56,6%) überrepräsentiert ($p < 0,005$). Neun Fälle (0,2%) verstarben im Zusammenhang mit der EHEC-Infektion. Für 47,2% der Fälle wurden Angaben zur Serogruppe gemacht: Am häufigsten wurden O157 (20,8%), O103 (19,9%), (12,9%) und O91 (6,6%) genannt. Dabei war der Altersmedian für Fälle mit Serogruppen-Information signifikant niedriger (35 Monate) als für Fälle ohne (11 Jahre). Der Altersmedian lag für alle Serogruppen zwischen 0 und 4 Jahren, außer für selbstagglutinierende (Orah) oder nicht typisierbare (Ont) Stämme, O91 und O113 (19-41 Jahre). Im Ausland erworben wurden 9,8% der EHEC-Fälle, darunter die meisten (2,6% aller Fälle) in der Türkei. Die Serogruppen O111 und O26 wurden unter dort erworbenen Infektionen überproportional häufig nachgewiesen.

In der Kategorie HUS wurden 55-118 Fälle pro Jahr, insgesamt 398 Fälle, übermittelt. Zwei große Ausbrüche 2002 wurden durch Sorbitol-fermentierende EHEC des Serotyps O157:H- verursacht. Im Vergleich zu in der Kategorie EHEC übermittelten Fällen waren bei HUS-Fällen unter 5 Jahren Mädchen mit 54,2% stark überrepräsentiert ($p = 0,003$). Insgesamt 19 Todesfälle im Zusammenhang mit HUS (4,9% der Fälle) wurden übermittelt. Eine Serogruppe wurde in 68,3% der Fälle angegeben, wobei dieser Anteil 2005 auf 53% fiel. Die am häufigsten übermittelten Serogruppen waren O157 (83,5%) und O26 (6,6%). Der Altersmedian lag bei 3 Jahren. In Bezug auf O157 unterschied sich der Altersmedian der HUS-Fälle (33,5 Monate) nicht von dem der EHEC-Fälle.

In beiden Kategorien übermittelte Fälle erkrankten am häufigsten im Spätsommer, wobei der Median des Erkrankungsdatums von HUS 14 Tage später lag als bei EHEC. Bei einigen Serogruppen, deren Anteil *eaeA*-positiver Stämme gering ist, ist die Saisonalität kaum ausgeprägt (z. B. O91).

Diskussion: EHEC-Infektionen und HUS stellen weiterhin ein großes Public Health-Problem in Deutschland dar. Diese und weitere präsentierte Auswertungen der Meldedaten ergeben wichtige bevölkerungsbasierte Hinweise auf die Epidemiologie dieser Infektionen, die im Zusammenhang mit Erkenntnissen hinsichtlich Erregerreservoir und Pathogenese weitergehend analysiert werden sollten.

II. Kohortenstudie zu sekundären Haushaltsübertragungen Shigatoxin produzierender *Escherichia coli* der Serogruppe O157 – eine Möglichkeit zur Intervention?

Dirk Werber¹, Brendan W Mason², Meirion R Evans², Roland L Salmon²

¹ Abteilung für Infektionsepidemiologie, RKI, Seestraße 10, 13353 Berlin

² Communicable Disease Surveillance Centre, National Public Health Service of Wales

Schlüsselwörter: *Escherichia coli* O157, Disease Transmission, STEC, HUS, Sekundärinfektionen

Einführung: Ein großer überregionaler Ausbruch durch Shigatoxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) der Serogruppe O157 ereignete sich im Herbst 2005 im Süden von Wales, Großbritannien. In vielen der betroffenen Haushalte gab es mehr als einen Fall, und häufig wurde ein sekundärer Übertragungsweg vermutet. Wir initiierten eine Studie um zu evaluieren, ob Basisinformationen über den Indexfall oder den dazugehörigen Haushalt Determinanten für das Risiko einer Sekundärinfektion im Haushalt waren. Darüber hinaus schätzten wir den Anteil der Sekundärfälle, die durch Isolierung (z.B. Hospitalisierung) des Indexfalles, unmittelbar nach der Labordiagnose, potenziell vermeidbar gewesen wären.

Methoden: Wir führten eine retrospektive Kohortenstudie unter Haushalten durch, die Ausbruchs-assoziierte STEC O157 Fälle hatten. Die Untersuchungseinheit war der Haushalt, der auf das Vorkommen von Sekundärinfektionen untersucht wurde. Informationen über STEC O157 Fälle und deren Haushaltsmitglieder wurden zusammengeführt aus Unterlagen der öffentlichen Gesundheitsbehörden und persönlichen Interviews mit für den Infektionsschutz zuständigen Mitarbeitern. Ausgehend von den Erkrankungszeitpunkten wurden STEC O157 Fälle als primär („Indexfälle“), ko-primär oder sekundär klassifiziert. Determinanten für Sekundärfälle im Haushalt wurden durch den Einsatz multivariabler Regressionsmodelle identifiziert. Wir klassifizierten Fälle als potenziell vermeidbar, wenn ihre Erkrankung mehr als 4 Tage nach der Labordiagnose des Indexfalles begann.

Ergebnisse: Von den 98 Haushalten mit Ausbruchsfällen in der Studienregion, wurden 89 (91%) zur Analyse herangezogen; 20 (21%) hatten Sekundärfälle. Von 25 Sekundärfällen waren 13 (56%) Geschwisterkinder des Indexfalles und vier entwickelten ein hämolytisch-urämisches Syndrom. Alter des Indexfalles (<5 Jahre) und das Vorkommen eines Geschwisterkindes im Haushalt, aber nicht die Haushaltsgröße, waren unabhängige Determinanten für Sekundärfälle. Von 15 Sekundärfällen mit vollständiger Information, waren sieben (46%) potenziell vermeidbar.

Diskussion: Sofortige Trennung pädiatrischer STEC O157-Patienten von ihren Geschwistern ist offenbar eine Interventionsmaßnahme mit hohem Präventionspotenzial. In Deutschland wäre hierfür jedoch, über die derzeitigen labordiagnostischen Standards niedergelassener Labore hinausgehend, der unverzügliche und schnelle Nachweis von STEC O157-Stämmen erforderlich.

III. Intensivierte Surveillance des hämolytisch-urämischen Syndroms in Bayern – Ergebnisse des Jahres 2006

Annette Heißenhuber¹, Wolfgang Hautmann¹, Maria-Sabine Ludwig¹, Florian Burckhardt¹, Erwin Lutz², Manfred Wildner¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),
Veterinärstraße 2, 85764 Oberschleißheim, annette.heissenhuber@lgl.bayern.de

² Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz

Schlüsselwörter: Hämolytisch-urämisches Syndrom, HUS, Surveillance, Bayern, EHEC, STEC, Hemolytic uremic syndrom, HUS, surveillance, Bavaria, EHEC, STEC

Einleitung und Zielsetzung

Nach wie vor ist unklar, welche Faktoren oder Prädispositionen nach einer Infektion mit enterohämorrhagischen E. coli-Bakterien zum Auftreten des hämolytisch-urämischen Syndroms führen. Diskutiert wird eine Vielzahl von möglichen Einflussfaktoren. Mithilfe der intensivierten HUS-Surveillance, für die seit dem 01.01.2006 ein neuer Fragebogen eingeführt wurde, werden alle Fälle von HUS in Bayern detaillierter als durch das IfSG vorgeschrieben erfasst. Zusätzlich wird eine möglichst vollständige Labordiagnostik angestrebt. Der Fragebogen zur intensivierten HUS-Surveillance bietet den Mitarbeitern der Gesundheitsämter erste Anhaltspunkte zu möglichen Risikofaktoren und/oder Infektionsquellen für den betreffenden Fall und hilft somit den Fortgang der Ermittlung standardisiert und bayernweit einheitlich zu lenken.

Daten und Methoden

Fragebogen

Der Fragebogen zur intensivierten Surveillance von HUS wurde in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz (StMUGV) erstellt. Es werden klinische Angaben, Symptome, Informationen zur erkrankten Person, zu den Prädispositionen, zu den möglichen Infektionsquellen und Risikofaktoren erfragt. Zusätzlich werden durchgeführte Laboruntersuchungen dokumentiert. Die Befragung der Erkrankten bzw. deren Erziehungsberechtigten wurde von Mitarbeitern der zuständigen Gesundheitsämter durchgeführt.

Ergebnisse

Im Jahr 2006 wurden in Bayern 17 Fälle von HUS gemeldet. Damit entspricht die im Jahr 2006 gemeldete Fallzahl in etwa dem jährlichen Durchschnitt seit 2001. Die mittlere Zeitdauer zwischen Diagnosestellung und Befragung der Erkrankten betrug 8,6 Tage. In 70 % der 2006 gemeldeten HUS-Fälle waren Kinder im Alter bis sechs Jahren betroffen. Die Verteilung der HUS-Fälle nach Erkrankungsmonat zeigt eine Häufung der Fälle im Sommer und Herbst 2006. Die Regierungsbezirke Schwaben, Oberbayern und Mittelfranken hatten 2006 bayernweit die höchsten HUS-Inzidenzen. Das HUS-Symptom Anämie gaben 88,2 % der Fälle an, Thrombozytopenie wurde für alle Fälle bejaht und Nierenversagen gaben sechs Fälle (6/12 = 50 %) an, bei fünf Fällen fehlten hierzu Angaben. Alle HUS-Fälle hatten Durchfall, im Mittel wurde die Diagnose HUS 6,3 Tage nach Beginn des Durchfalls gestellt (Median: 5,5 Tage, Minimum – Maximum: 0 – 18). Bei 14 Fällen war labordiagnostisch ein EHEC-Nachweis möglich. Dieser Nachweis erfolgte bei allen Untersuchten mittels Shigatoxin-Gennachweis. Für 13 Fälle liegen Angaben zur Serogruppe vor.

Die Serogruppe O157 wurde mit 43 % am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von O26 und O145. Außerdem wurde je einmal O2 und O158 gefunden. Bei zwei Erkrankten mit Serogruppennachweis konnte im familiären Umfeld der gleiche EHEC-Serovar wie beim Erkrankten nachgewiesen werden (O157 und O26). Bei drei weiteren HUS-Erkrankten wurden in der Umgebungsuntersuchung andere EHEC-Serovare als beim Erkrankten nachgewiesen. Bei der Umgebungsuntersuchung eines HUS-Falls ohne labor-diagnostischen EHEC-Nachweis konnte bei drei Familienmitgliedern ein identischer EHEC-Serovar nachgewiesen werden (O26).

Die Surveillance bietet die Möglichkeit einer gezielten Erweiterung im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie.

IV. HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische *E. coli* O157:H- in Norddeutschland im Frühjahr / Sommer 2006

Angelika Fruth¹, Rita Prager¹, Daniel Sagebiel², Christina Frank², Katharina Alpers², Johannes Dreesmann³, Matthias Pulz³, Alexander Friedrich⁴, Angelika Speicher⁵, Peter Roggentin⁶

¹ Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, NRZ Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Burgstraße 37, 38855 Wernigerode

² Robert Koch-Institut, Abteilung Infektionsepidemiologie, Berlin

³ Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (NLGA), Hannover

⁴ Institut für Hygiene, Universität Münster

⁵ Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

⁶ Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg

Schlüsselwörter: HUS, EHEC, SF O157:H-, Ausbruch

Keywords: HUS, EHEC, SF O157:H-, outbreak

Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) im Kindesalter wird in erster Linie durch eine Infektion mit enterohämorrhagischen *E.coli* (EHEC) induziert [1]. Als bedeutendster Erreger ist hierbei der *E.coli* des Serovars O157:H7 anzusehen.

1988 wurde erstmals von Karch [2] ein neuer Typ dieses Serovars beschrieben, welcher sich bakteriologisch durch die Fähigkeit der Fermentierung von Sorbitol vom klassischen O157:H7 unterscheiden ließ. Dieser Serovar SF O157:H- hat seitdem 4 Ausbrüche in Deutschland (hauptsächlich Süddeutschland) ausgelöst [3].

Es wird von einem weiteren Ausbruch berichtet, welcher sich 2006 erstmals in Norddeutschland ereignete.

Im Verlauf der 18. bis 33. KW erkrankten 18 Kinder an HUS. 11 von diesen Fällen konnten eindeutig durch Analyse der Virulenzfaktoren und PFGE-RFLP einem Klon von SF O157:H- zugeordnet werden. Durch intensive Screening-Diagnostik der niedergelassenen mikrobiologischen Labore konnten erstmals im gleichen Zeitraum Isolate des Ausbruchsklons von weiteren Fällen (2 Patienten mit Diarrhö und 1 asymptomatischer Ausscheider) detektiert werden, die nicht in Kontakt zu den HUS-Patienten standen. Ein kausatives Agens konnte nicht ermittelt werden.

Literatur:

[1] Tarr, P.I., Gordon, C.A., Chandler, W.L.(2005): Lancet 365:1073-1086.

[2] Karch, H., Böhm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, S., Heesemann, J.(1993): Clin. Microbiol. 31:1200-1205.

[3] Alpers, K. et. al. (2007): JID, in press

V. Untersuchung eines EHEC-Ausbruchs mit 59 Fällen nach einem Ferienlager mit Rohmilchverzehr durch eine retrospektive Kohortenstudie

Johannes Dreesman¹, Hanns Rüdiger Röttgers², Alexander Mellmann³, Matthias Pulz¹

¹ Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Hannover, Roesebeckstr. 4-6, 30449 Hannover, Johannes.Dreesman@nlga.niedersachsen.de

² Landkreis Vechta – Gesundheitsamt,

³ Konsiliarlabor für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS) am Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

Schlüsselworte: Ausbruchsuntersuchung, EHEC O80:H-, HUS, Rohmilch

Hintergrund: Nach einem auswärtigen Ferienlager im August 2006 mit 120 Teilnehmern aus dem Landkreis Vechta im Alter von 6 bis 13 Jahren inkl. erwachsenen Betreuern erkrankte ein 11-jähriges Mädchen an einem Hämolytisch-Urämischem-Syndrom (HUS). Daraufhin ermittelte das zuständige Gesundheitsamt, dass im Ferienlager Rohmilch aus einem landwirtschaftlichen Betrieb verzehrt worden war und dass dort Gastroenteritiden bei mehr als der Hälfte der Teilnehmer aufgetreten waren.

Methodik: Bei einer unverzüglich einberufenen Informationsveranstaltung bat das Gesundheitsamt Vechta alle Teilnehmer des Ferienlagers, Stuhlproben für eine mikrobiologische Diagnostik einzusenden sowie einen Fragebogen zu Symptomen und möglichen Risikofaktoren auszufüllen. Die Auswertung erfolgte als retrospektive Kohortenstudie. Die Behörden des Landkreises, in dem das Ferienlager stattgefunden hatte, wurden informiert und veranlassten die Untersuchung von Milchproben sowie von Kotproben der Rinder des Milcherzeugers.

Ergebnisse: In den Stuhleinsendungen von 114 Teilnehmern konnte viermal EHEC mittels PCR nachgewiesen werden, dreimal wurde EHEC O80:H- isoliert. In der Stuhlprobe des HUS-Falles wurde EHEC O145 nachgewiesen. Von 105 Teilnehmern, die auch den Fragebogen ausgefüllt hatten, erfüllten 59 die RKI-Surveillance-Falldefinition als labordiagnostisch- oder epidemiologisch-bestätigter EHEC-Fall. In der Auswertung wurde die stärkste Assoziation der Erkrankung mit dem Rohmilchverzehr zwei Tage vor Beginn des Ausbruchs festgestellt ($OR > 12$, $p < 0,001$). Alle Fälle hatten an diesem Tag Rohmilch getrunken. Mit keinem anderen Lebensmittel oder Risikofaktor ergab sich eine signifikante Assoziation. Die veterinärmedizinischen Untersuchungen der Milch- und Kotproben erbrachten keine EHEC-Nachweise.

Schlussfolgerungen: Der Rohmilchverzehr kann aufgrund der epidemiologischen Ergebnisse mit hoher Sicherheit als Infektionsquelle angesehen werden. Bei der Bewertung der negativen Befunde der Milch- und Kotuntersuchungen ist einerseits der zeitliche Verzug der Untersuchungen zu berücksichtigen, andererseits die biologisch begründeten grundsätzlichen Schwierigkeiten reproduzierbarer EHEC-Nachweise bei Rindern. Die Sensibilisierung der Verbraucher gegenüber den Risiken des Rohmilchverzehrs muss weiterhin Gegenstand präventiver Bemühungen bleiben.

VI. Epidemiologie des EHEC assoziierten HUS

Epidemiology of EHEC associated Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS)

Lothar Bernd Zimmerhackl^ü, Angela Gerber³, Pamela Peditwill¹, Johanna Scheiring¹, Stephan Martini⁴, Dorothea Orth¹, Barbara Petzlberger¹, Wilhelm Oberaigner¹, Reinhard Würzner¹ and Helge Karch²

¹ Medical University Innsbruck, Austria and ² Universities Münster, ³ Freiburg and

⁴ München, Germany; Lothar-Bernd.Zimmerhackl@uki.at

^üsupported by EU-Biomed 2, BMBF, APN, ESPN and Medical University Innsbruck

Haemolytic uraemic syndrome (HUS) is the most common cause of acute renal failure in children. The syndrome is defined by the triad of microangiopathic haemolytic anaemia, thrombocytopenia and acute renal failure (creatinine over the 97th percentile). World wide HUS is increasing. In a German/Austrian multicenter study we follow 628 children with HUS occurring in the years 1997 to 2002. 5-year follow-up data are now available at www.hus-online.at. From this study the following results are obvious. HUS affects predominantly children of kindergarden age. The median age at onset is 2.9 years. The majority of HUS is of infectious origin. Shigatoxin (Stx) producing Escherichia coli (STEC, EHEC) are present in over 80% of patients. The predominant shigatoxin type is type II. HUS is classified into two clinical subgroups. "Typical" HUS usually occurs after a prodrome of diarrhoea (D+HUS), and "atypical" HUS (aHUS), which is not associated with diarrhoea (D-HUS). The majority of D+HUS worldwide is caused by EHEC type O157:H7, which is transmitted to humans via different routes. However non-O157 groups are emerging and are predominant in Europe. Transmission of disease in elder patients is predominantly through food poisoning and direct contact to farm animals. In infants and small children direct transmission from human to human seems to be more likely. Currently there are no specific therapies preventing the disease course. Anti-shigatoxin antibodies are being tested by several companies. If this may prevent HUS is open to study. Otherwise the therapy at present is symptomatic. Parenteral volume expansion before HUS in patients with positive Stx or EHEC stool culture may counteract the effect of thrombotic process before development of HUS and attenuate renal injury. Use of antibiotics, antimotility agents, narcotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs should be avoided during the acute phase in particular during the prodromal phase. From our own study the prevention is best done by preventing primary EHEC infection. However, patients with severe course and long term sequelae should be screened for genetic abnormalities in the complement system! If auto antibodies against complement proteins or the vWF play a relevant role is under discussion. Patients under one year of age at onset have a significant worse outcome and should be kept under surveillance. Patients below 3 month of age are very likely to have an inborn error of complement or vWF and should be tested specifically. The European registry on HUS and related disorders may help to determine these abnormalities: www.haemolytic-uraemic-syndrome.org. In order to improve long term outcome of these patients, increased awareness and a European (International?) task force is mandatory.

VII. Phylogenetische Analysen enterohämorrhagischer *E. coli* von HUS-Patienten

Alexander Mellmann¹, Robin Köck, Ralf Fischer, Martina Bielaszewska, Alexander W. Friedrich, Helge Karch

Konsiliarlaboratorium für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS) am Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

¹ Institut für Hygiene, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster, mellmann@uni-muenster.de

Schlüsselworte: Epidemiologie, EHEC, MLST, Typisierung

Keywords: Epidemiology, EHEC, MLST, typing

Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) zählen in den industrialisierten Ländern zu den häufigsten Ursachen für das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS). Neben den vorherrschenden EHEC-Serotypen O26:H11, O111:H8, O103:H2, O145:H28 und O157:H-/H7 sind in den letzten Jahren in Deutschland zunehmend neue Serotypen (z.B. O73:H18, O91:H21, O104:H21, O112:H- und O113:H21) bei Patienten mit HUS nachgewiesen worden. Die Entstehung, Verwandtschaft und Epidemiologie dieser Klone sind bisher unklar. Seit einigen Jahren wird die Multilocus Sequenz Typisierung (MLST) als das Goldstandardverfahren zur phylogenetischen Analyse bakterieller Populationen angesehen. Hierbei werden üblicherweise sechs bis acht interne Fragmente (ca. 500 bp) sogenannter Haushaltsgene („house-keeping genes“), die für den Organismus essenziell sind, sequenziert. Für jedes Gen werden hierbei den unterschiedlichen Allelen fortlaufende Nummern zugeordnet. Der numerische Sequenztyp (ST) als das Typisierungsergebnis setzt sich aus der Kombination der Allele der einzelnen Haushaltsgene zusammen. Die in einer Internet-basierten Datenbank verwalteten Allel- und Sequenzdaten ermöglichen den problemlosen Vergleich von weltweit gewonnenen Isolaten. Zusätzlich sind in den Datenbanken auch Detailinformationen über die einzelnen Isolate (z.B. Resistenz-, epidemiologische und klinische Daten) abrufbar. Schließlich sind entsprechende bioinformatische Tools entwickelt worden, die eine genauere Darstellung einer Populationsstruktur ermöglichen. Die sicherlich bekannteste Anwendung ist der BURST-Algorithmus („Based Upon Related Sequence Types“), der eine Gruppierung von verwandten STs ermöglicht (<http://eburst.mlst.net/>). Die Analyse des vorherrschenden Serotyps O157:H-/H7 ergab, dass dieser ausschließlich im durch BURST gruppierten klonalen Komplex (CC) 11 vorkommt. Zu dem gleichen CC gehören auch die Sorbit-fermentierenden EHEC O157:H-. Die bisher analysierten mit HUS assoziierten O26 haben den nicht verwandten ST29. Insgesamt zeigen die Untersuchungen eine phylogenetische Heterogenität der mit HUS assoziierten EHEC-Serotypen. Die Analysen haben gezeigt, dass mittels MLST das Erkennen und die Ausbreitung neuer Klone, nicht jedoch eine Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen *E. coli* aufgrund der für phylogenetische Analysen bewusst niedrigeren Diskriminationsfähigkeit der MLST möglich ist.

VIII. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro is the determinant factor in the appearance of the haemolytic uraemic syndrome

Dorothea Orth, Katharina Grif, Abdul-Basit Khan, Asma Naim, Manfred P. Dierich, Reinhard Würzner

Austrian Reference Laboratory for EHEC at the Department of Hygiene, Microbiology and Social Medicine, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria, Dorothea.Orth@i-med.ac.at

Shiga toxins (Stx) are believed to play a key role in the pathogenesis of diseases caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), including the potentially life-threatening haemolytic uraemic syndrome (HUS). In this study, 201 STEC strains collected from patients and environmental sources were investigated with regard to the *stx* genotypes and pathogenicity. The *stx*₂ and *stx*_{2c} alleles were associated with high virulence and the ability to cause HUS, whereas *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*₁ and *stx*_{1c} occurred in milder or asymptomatic infections. Quantification of Stx using an enzyme-immunoassay and the Vero cell cytotoxicity assay showed no significant differences between the strains associated with HUS and those causing milder diseases. We hypothesize that the *stx* genotype and perhaps other, yet unknown virulence factors rather than the amount of Stx or the in vitro cytotoxicity, are the major determinants for the development of HUS.

B. EHEC und Lebensmittel / Nachweisverfahren und Diagnostik

- I. **Is it time for a new standard in Escherichia coli serotyping?**
H. Hächler et al., Bern
- II. **Eigenschaften von Shiga (Vero) Toxin bildenden E. coli aus Lebensmitteln in Deutschland, Konsequenzen für den Verbraucherschutz**
L. Beutin et al., Berlin
- III. **Nachweis von Shiga Toxin bildenden Escheria coli (STEC) Eigenschaften von Shiga (Vero) Toxin bildenden E. coli aus Lebensmitteln**
U. Messelhäußer et al., Oberschleißheim

I. Is it time for a new standard in *Escherichia coli* serotyping?

Karin Ballmer¹, Bozena M. Korczak¹, Peter Kuhnert¹, Peter Slickers², Ralf Ehricht² and Herbert Hächler^{1,3}

¹ Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse-Faculty, University of Berne, CH-3001 Berne, Switzerland

² Clondiag Chip Technologies GmbH, D-07743 Jena, Germany

³ National Centre for Enteropathogenic Bacteria, Institute for Medical Microbiology, Cantonal Hospital of Lucerne, CH-6000 Lucerne 16, Switzerland

Keywords: *Escherichia coli*, serotyping, DNA microarray

Serotyping of *Escherichia coli* is currently based on classical agglutination techniques. It serves for diagnostic and epidemiological purposes, and also offers predictive hints for the determination of pathotypes of e.g. enteropathogenic *E. coli* variants such as verotoxin-producing *E. coli*, etc. Thus, serotyping is a valuable and versatile tool. However, it is so costly, tedious and technically challenging that only few reference laboratories can afford to offer a routine service. To improve this situation we developed and validated a genetic approach for serotyping based on the microarray technology. In order to design a method offering optimal compatibility with classical serotyping, genes critical for expression of the serotype were searched for. The genes encoding the O-antigen flippase (*wzx*) and the O-antigen polymerase (*wzy*) were selected as target sequences for the O antigen, whereas *fliC* and related genes, which code for the flagellar monomer, were chosen as hallmarks of the H phenotype. Based on a comprehensive bio-informatic analysis a set of oligonucleotide probes for array-spotting was designed. A microarray assay based on the ArrayTube technology (Clondiag, Jena, Germany) was then established. In order to improve signal to background ratios and thus specificity, a multiplex linear amplification step – combined with DNA labeling – of the regions of interest was inserted after DNA extraction. The extraction mixture containing the biotinylated linear amplicons was then hybridized to the ArrayTube. The microarray contained oligonucleotide DNA probes, each in duplicate, representing 24 of the epidemiologically most relevant of the over 180 known O antigens as well as 47 of the 53 different H antigens. Evaluation of the microarray with a set of reference strains representing all O and H serotypes covered yielded encouraging results. The array's sensitivity and specificity in recognition of the given serotypes were 96% and 90%, respectively. All of the conventionally typed 24 O groups and all of the 47 H serotypes were correctly identified, at least with one reference strain. Moreover, several "non-motile" or "non-typeable" strains yielded unequivocal results with the novel ArrayTube assay, and were thus serotyped for the first time. With respect to these strains, array-typing was clearly superior to classical agglutination. The protocol is simple, and one colony can be typed within a single working day. The presented study has been published in 2007 [1].

Literature:

- [1] Ballmer K et al. 2007. Fast DNA Serotyping of *Escherichia coli* by Use of an Oligonucleotide Microarray. J. Clin. Microbiol. **45**:370-379.

II. Eigenschaften von Shiga (Vero) Toxin bildenden *E. coli* aus Lebensmitteln in Deutschland, Konsequenzen für den Verbraucherschutz

Lothar Beutin, Angelika Miko, Gladys Krause, Karin Pries, Katja Steege, Sabine Haby, Nadine Albrecht

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli*,
Zentrum für Infektiologie und Erregercharakterisierung, Diedersdorfer Weg 1, D-12277 Berlin,
Germany

Shiga (Vero) Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC) verursachen bei Menschen hauptsächlich Durchfallerkrankungen, die sich bis zu lebensbedrohlichen Verläufen mit Folgeschäden wie hämorrhagische Colitis (HC) und Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS) entwickeln können [1,2]. STEC zeigen eine große Variabilität in ihren Phänotypen und mehr als 200 *E. coli* Serotypen können dieser Gruppe bisher zugeordnet werden. Landwirtschaftliche Nutz- und Wildtiere sind ein natürliches Reservoir für STEC, die Keime werden von in der Regel symptomlos infizierten Tieren mit dem Kot ausgeschieden und gelangen dadurch in die Umwelt. Durch Kotspuren kontaminierte Lebensmittel gelten als Hauptquelle für Infektionen des Menschen mit STEC [2]. Besonders in den angelsächsischen Ländern, aber auch in Japan und Argentinien traten wiederholt große Ausbrüche an Infektionen hauptsächlich mit STEC O157 auf, die auf Verzehr bakteriell kontaminierter Lebensmittel (Fleisch, Milch, Gemüse, Trinkwasser) zurückzuführen waren [1,2]. Ungeachtet der Typenvielfalt in dieser *E. coli* Gruppe konnten relativ wenige, bestimmte STEC Typen besonders häufig mit schweren Krankheitsverläufen (HC und HUS) in Zusammenhang gebracht werden. Für die Vertreter dieser Gruppen (O26, O103, O111, O145, O157 u. a.) wurde der Begriff enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) eingeführt [1]. Epidemiologische Untersuchungen in verschiedenen Ländern konnten zeigen, dass bestimmte Serotypen und Virulenzmerkmale wie Bildung von Stx2, Intimin als Adhärenzfaktor und das EHEC-Virulenzplasmid signifikant häufig bei sogenannten typischen EHEC und bei schwerwiegenden Krankheitsverläufen vorliegen [3-6]. Allerdings wurden auch andere STEC (atypische EHEC) mit HC und HUS in Zusammenhang gebracht [1,2,7].

Bei Untersuchungen an mit STEC infizierten Patienten in Deutschland konnte eine Vielzahl von Serotypen festgestellt werden. Typische EHEC mit der Bildung von Intimin waren bei Kindern unter 6 Jahren vorherrschend. Diese Patienten stellen eine Risikogruppe für HC und HUS Erkrankungen dar. Atypische EHEC und STEC ohne Bildung von Intimin waren dagegen bei älteren Kindern und Erwachsenen mit Durchfallerkrankungen vorherrschend [6]. Bei den meisten in Deutschland registrierten STEC und EHEC Infektionen handelt es sich um sporadische Fälle, wobei die Ursache der Infektion in der Regel nicht ermittelt wird [3,4,6]. Neben Lebensmitteln spielt die Übertragung von Mensch zu Mensch, Tier zu Mensch, sowie die Umwelt (Wasser, Boden) als Vehikel eine wichtige Rolle [2]. Das Nationale Referenzlabor für *Escherichia coli* (NRL-*E. coli*) am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) beschäftigt sich u. a. mit der Charakterisierung von STEC aus Lebensmitteln, die von verschiedenen Einrichtungen in Deutschland zur weiteren Bestimmung eingesandt werden. In der vorliegenden Studie wurden 222 STEC Stämme aus dem NRL-*E. coli*, die aus Einzelproben von Lebensmitteln im Zeitraum 2005 und 2006 isoliert worden waren, auf ihre Virulenzeigenschaften und ihr Typenspektrum untersucht. Durch diese Untersuchung sollen Aussagen über das Vorkommen typischer und atypischer EHEC in Lebensmitteln, sowie von bestimmten Virulenzeigenschaften der STEC, die mit schweren Erkrankungen in Zusammenhang stehen, getroffen werden.

Diese Untersuchungen dienen dazu, in Deutschland erhältliche Lebensmittel in ihrer Bedeutung als mögliche Quelle von sporadischen Infektionen mit EHEC und STEC besser beurteilen zu können. Die Ergebnisse zeigen, dass die hier untersuchten Lebensmittel wie Fleisch, Milch und deren Produkte hauptsächlich mit atypischen EHEC, bzw. STEC kontaminiert waren. Typische EHEC wurden dagegen nur bei 1,8% der Proben nachgewiesen. Allerdings zeigten fast die Hälfte aller STEC Isolate Bildung von Stx2 oder Stx2-Varianten, die als ein Hauptvirulenzmerkmal für schwere Krankheitsverläufe gelten. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass die in Deutschland in Lebensmitteln vorherrschenden STEC hauptsächlich zu Gruppen gehören, die häufig bei Erwachsenen als Durchfallerreger identifiziert werden. Erreger, die bei Kindern hauptsächlich als Verursacher enterohämorrhagischer Erkrankungen (HC und HUS) im Vordergrund stehen, sind in Lebensmitteln eher selten und andere Übertragungswege (Mensch zu Mensch) scheinen bei diesen Erkrankungen von größerer Bedeutung zu sein.

Literatur:

- [1] Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201.
- [2] Beutin L. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. 2006 Sep;53:299-305.
- [3] Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J. Infect. Dis. 185:74-84.
- [4] Friedrich, A. W., J. Borell, M. Bielaszewska, A. Fruth, H. Tschäpe, and H. Karch. 2003. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. J. Clin. Microbiol. 41:2448-2453.
- [5] Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, and C. L. Gyles. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J. Clin. Microbiol. 37:497-503.
- [6] Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier. 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J. Clin. Microbiol. 42, 1099-1108.
- [7] Bonnet, R., B. Souweine, G. Gauthier, C. Rich, V. Livrelli, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier. 1998. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. J. Clin. Microbiol. 36:1777-1780.

III. Nachweis von Shiga Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung in Bayern (2003 - 2006)

Ute Messelhäußer¹, Peter Kämpf¹, Damaris Elmer-Englhard¹, Wolfgang Kleih¹, Christiane Höller¹, Gesine Schulze², Ursula Pudich², Hermann Schreiner², Hubert Diepolder², Ulrich Busch¹

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

¹ Dienststelle Oberschleißheim, Veterinärstraße 2, 85764 Oberschleißheim

² Dienststelle Erlangen, Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind eine neue, erstmals 1983 beschriebene Gruppe darmpathogener Bakterien, die heute weltweit als Ursache verschiedener intestinaler Erkrankungen unterschiedlichen Schweregrades bekannt sind und bei denen mit zum Teil schweren postinfektiösen Erkrankungen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) oder die thrombozytopenische Purpura (TTP) zu rechnen ist. Landwirtschaftliche Nutztiere (vor allem Rinder und kleine Wiederkäuer) gelten als das primäre Reservoir für eine EHEC-Erkrankung des Menschen, da man davon ausgeht, dass Shiga Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC) bei erwachsenen Wiederkäuern zur normalen Darmflora gehören; die Tiere selbst zeigen meist keine Krankheitssymptome. Insofern stellen Lebensmittel tierischen Ursprungs eine bedeutende Infektionsquelle für den Menschen dar. Rohmilch, rohes Hackfleisch oder auch streichfähige Rohwürste gehören zu den klassischen Auslösern lebensmittelbedingter EHEC-Infektionen. Aber auch Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs, die mit Rinderkot, beispielsweise durch Düngung, oder kontaminiertem Wasser in Kontakt kommen, können zu Erkrankungen führen, wie gerade einige der letzten großen Ausbrüche 2006 in den USA (Spinat) oder in Japan (Rettich) zeigen.

Im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung werden deshalb in Bayern jährlich zwischen 1.000 und 1.500 Lebensmittelproben tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie Umgebungsproben in der Routinediagnostik mittels PCR- und real-time-PCR in Kombination mit einer DNA-Kolonieblothybridisierung auf EHEC bzw. STEC untersucht. Daten aus Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Probenplananforderungen sowie von Verdachts- und Umgebungsproben einzelner Ausbruchgeschehen aus den Jahren 2003 bis 2006 werden vorgestellt.

C. EHEC-Reservoir Tier

- I. **Finished pigs – an animal reservoir for O157 and non-O157 STEC**
R. Stephan et al., Zürich
- II. **Untersuchungen zum Einfluss des Shigatoxin-Antikörpertiters auf die STEC-Ausscheidung bei Kälbern**
Ch. Menge et al., Gießen
- III. **Rinderdichte – Ein Risikofaktor für viele, aber nicht alle Serogruppen Shigatoxin produzierender Escherichia coli in Deutschland**
K. Stark et al., Berlin

I. Finished pigs – an animal reservoir for O157 and non-O157 STEC

R. Stephan¹, Lothar Beutin², Jorge Blanco², Claudio Zweifel¹

¹ Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, 8057 Zurich, Switzerland

² Federal Institute for Risk Assessment (BfR), National Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, Germany

³ Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela (USC), Lugo, Spain

Since a high degree of genetic relatedness between O101 strains harboring *stx2e* of human and porcine origin was demonstrated (Franke et al., 1995), the role of pigs as asymptomatic carriers of STEC needs further research. In the present study, fecal samples from slaughtered fattening pigs were examined by polymerase chain reaction for *stx* (STEC, n=678) and *rfbE* (O157, n=630) genes. Strains were isolated by colony hybridization and were further characterized by phenotypic and genotypic traits. The proportion of positive samples was 22.2% for *stx* and 7.5% for *rfbE*.

The 32 isolated *stx*-positive strains (31 sorbitol-positive) belonged to non-O157 STEC and comprised the following serotypes: O8:H9; O9:H-; O65:H-; O100:H-; O103:H2; O141:H17; O159:H-; ONT:H-; ONT:H10; ONT:H19. Three of them (O9:H-; O100:H-; ONT:H-) accounted for 69% of strains. Nine of the 31 sorbitol-positive non-O157 STEC belonged to serotypes found in STEC isolated from humans, including two serotypes (O9:H-, O26:H-) reported in association with hemolytic-uremic syndrome. Otherwise, the serotypes were different from those isolated from pigs suffering from edema disease. One of the 32 strains was *stx1*-positive, whereas all other strains harbored *stx2e* genes. The gene for intimin (*eae*), which is strongly correlated with severe human disease, was not detected. Moreover, all strains were lacking the genes for enterohemolysin (*ehxA*), porcine A/E associated protein (*paa*), STEC autoagglutinating adhesin (*saa*) and the serin protease EspI (*espI*). Nine strains tested positive for *astA* (EAST1), one O141:H17 strain for *fedA* (F18 fimbrial adhesin) and one O159:H- strain for *terF* (tellurite resistance). Similar to the *Stx2e*-producing *E. coli* isolated from humans, which are mainly lacking further virulence factors, genes of an iron uptake system on the high-pathogenicity island (*irp2*, *fyuA*) were detected in three ONT:H10 and ONT:H19 strains from healthy pigs.

Moreover, among the 31 isolated *E. coli* O157 strains, 30 were positive for sorbitol fermentation, all were negative for *stx*, and four strains were positive for *eae*. Therefore, the fact is emphasized that *E. coli* with the O157 antigen are not always STEC, but can also be EPEC.

The fecal carriage of foodborne pathogens among livestock animals at slaughter is strongly correlated with the hazard of carcasses contamination. In order to reduce the risk represented by STEC and EPEC, the maintenance of slaughter hygiene is consequently of central importance in meat production.

II. Untersuchungen zum Einfluss des Shigatoxin-Antikörpertiters auf die STEC-Ausscheidung bei Kälbern

Julia Fröhlich, Georg Baljer und *Christian Menge*

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität, Frankfurter Str. 85-89, 35392 Gießen

Schlüsselwörter: STEC-Ausscheidung, Rind, Shigatoxin, Antikörper, kolostrale Immunität

Keywords: STEC shedding, cattle, Shiga toxin, antibodies, colostral immunity

Kälber infizieren sich bereits in den ersten Lebenswochen mit Shigatoxin bildenden *E. coli* (STEC) und scheiden zu einem hohen Prozentsatz den Erreger über einen längeren Zeitraum aus. Die Persistenz der STEC-Infektion wird wahrscheinlich durch die Shigatoxin-(Stx-)Bildung begünstigt, da Stx die Ausbildung einer STEC-spezifischen zellulären Immunität verzögern. Im Hinblick auf die Entwicklung einer Immunprophylaxe zur Bekämpfung der STEC-Ausscheider wäre es deshalb wichtig zu wissen, welchen Einfluss der Antitoxintiter auf die STEC-Ausscheidung beim Kalb hat. Bislang ist auch unbekannt, inwieweit die kolostrale Immunität das Infektionsrisiko und die Ausscheidungs-raten von STEC bei Kälbern beeinflusst.

Zur Aufklärung dieser Fragen wurden von 27 konventionell gehaltenen Kälbern zwischen der Geburt und der 12. Lebenswoche wöchentlich, bis zur 24. Lebenswoche zweiwöchentlich, Serum- und Kotproben gewonnen. Von den Muttertieren wurden einmalig Serum- und Kolostrumproben untersucht. Der Verozell-Neutralisationstest diente der Quantifizierung Stx1- und Stx2-spezifischer Antikörper in Serum- und Kolostrumproben. Der Nachweis der STEC-Ausscheidung wurde durch den Stx-Gennachweis im Kot mittels spezifischer PCR für die Toxin-Subtypen *stx1*, *stx2*, *stx2c* und *stx2d* geführt.

Im Untersuchungszeitraum schieden 24 Kälber mindestens einmal *stx1* und 26 Tiere mindestens einmal *stx2* oder einen *stx2*-Subtyp aus. Bei 24 Kälbern gelang ein *stx*-Nachweis in den Kotproben an mindestens 3 und an bis zu 13 Zeitpunkten. Neutralisierende Antikörper gegen Stx2 konnten in geringen Titern nur bei 3 der untersuchten Muttertiere in Serum und Kolostrum sowie in Serumproben ihrer Jungtiere unmittelbar nach der Geburt nachgewiesen werden. Die Seren und Kolostraten aller Muttertiere und die postkolostralen Serumproben von 25 der 27 Kälber wiesen Titer Stx1-spezifischer Antikörper in unterschiedlicher Höhe auf. Zwischen der 2. und der 6. Lebenswoche fiel bei allen seropositiven Kälbern der Stx1-Antikörpertiter rasch bis in den Bereich der Nachweisgrenze ab. Obwohl bis zur 14. Lebenswoche 22 Tiere mindestens einmal *stx1* oder *stx2* ausschieden, war nur bei 5 Kälbern eine Stx1-spezifische Serokonversion am Ende des Untersuchungszeitraumes nachweisbar. Bei keinem Tier konnte eine Stx2-spezifische Serokonversion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die häufige STEC-Ausscheidung bei Kälbern in den ersten Lebenswochen in einen Zeitraum fällt, der durch das Fehlen eigener Stx-spezifischer Antikörper gekennzeichnet ist. Diese Koinzidenz bietet einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Immunisierungsverfahren zur Reduzierung der STEC-Prävalenz beim Rind.

III. Rinderdichte – Ein Risikofaktor für viele, aber nicht alle Serogruppen Shigatoxin produzierender *Escherichia coli* in Deutschland

Klaus Stark¹, Christina Frank¹, Stephan Kapfhammer², Dirk Werber¹, Leonhard Held³

¹ Abt. für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut, Seestraße 10, 13353 Berlin, StarkK@RKI.de

² Institut für Statistik, Universität München

³ Institut für Sozial- und Präventivmedizin, Universität Zürich

Schlüsselwörter: Zoonosen, Epidemiologie, STEC, HUS

Einführung: Shigatoxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) können schwere Gastroenteritis und das lebensbedrohliche hämolytisch-urämische Syndrom beim Menschen auslösen. Für Humaninfektionen mit der Serogruppe O157 werden Widerkäufer, insbesondere Rinder, als tierisches Reservoir angesehen. Eine Assoziation zwischen Erkrankungsinzidenz und Rinderkontakt ist durch verschiedene internationale Fall-Kontroll-Studien belegt. Für andere „nicht-O157“ Serogruppen jedoch, die mehr als 80% der übermittelten STEC-verursachten Gastroenteritiden in Deutschland hervorrufen, wurde die Bedeutung von Rindern als Infektionsquelle bislang kaum untersucht.

Methoden: Wir modellierten Rinderdichte (Datenquelle: HI-Tier-Datenbank, Bay. StMLF) auf die Meldeinzidenz humaner STEC-Gastroenteritis (ohne HUS) von 2001 bis 2003. In einem Bayesianischen Modell wurden räumlich korrelierte und nicht-korrelierte Residuen in der Analyse berücksichtigt.

Ergebnisse: Rinderdichte war statistisch signifikant positiv assoziiert mit der STEC-Gesamtinzidenz – pro 100 zusätzlich gehaltenen Rindern pro Quadratkilometer stieg das Risiko einer STEC-Infektion um 68%. Ebenfalls statistisch signifikant mit Rinderdichte assoziiert war die Serogruppen-spezifische Inzidenz der fünf bedeutsamsten Gruppen (O103, O111, O128, O145, O157 - für O26 nur borderline-signifikant). Kein Zusammenhang war erkennbar zwischen Rinderdichte und Inzidenz von O91-Infektionen. Für alle Serogruppen außer O91 war eine statistisch signifikante Saisonalität erkennbar, mit Inzidenzgipfeln im Sommer. Die Analyse der residualen Schwankungsbreite zeigte, dass neben der Rinderdichte weitere, bisher nicht bekannte Faktoren einen Einfluss auf die STEC-Inzidenz haben, und dass auch diese serogruppen-spezifisch und räumlich divers sind.

Diskussion: Trotz der Einschränkungen des ökologischen Studiendesigns zeigen die Ergebnisse klar, dass das Leben in einer Region mit vermehrter Rinderhaltung ein starker Risikofaktor für die Infektion mit den meisten STEC-Serogruppen darstellt. Bei O26 liegt die schwächere Ausprägung der Beziehung möglicherweise im besonders jungen Alter (Median: 1 Jahr) der Betroffenen begründet, welches eine eher indirekte Beziehung zwischen Rindern und Erkrankten nahelegt. Die Ausnahmestellung von O91 (keine Assoziation mit Rinderdichte, keine erkennbare Saisonalität) deutet, bei gegenüber den anderen Serogruppen erheblich höheren Altersmedian der Erkrankten (29 Jahre), eher auf die Wichtigkeit der Übertragung durch Lebensmittel, und ggf. sogar auf ein anderes Widerkäuferreservoir (z.B. Schafe) hin.

D. Andere *E. coli* Pathovaren

- I. **The inhibitory effect of *E. coli* Nissle 1917 on EPEC infection in a porcine in vitro model is mediated by its adherence via F1C fimbria**
P. Schierack et al., Berlin
- II. **Nachweis, Virulenzfaktoren und Typen enteroaggregativer *E. coli***
A. Lehmacher et al., Hamburg
- III. **Genomvariabilität, Evolution und Pathogenese extraintestinal pathogener *Escherichia coli* (ExPEC)**
S. Schubert et al., München

I. The inhibitory effect of *E. coli* Nissle 1917 on EPEC infection in a porcine *in vitro* model is mediated by its adherence via F1C fimbria

S. Kleta¹, M. Nordhoff¹, K. Tedin¹, L.H. Wieler¹, S. Oswald², T. Ölschläger², W. Bleiß³, G. Holland⁴, Peter Schierack¹

¹ Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Philippstr. 13, 10115 Berlin, schierack.peter@vetmed.fu-berlin.de

² Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg

³ Institut für Molekulare Parasitologie, Humboldt-Universität Berlin

⁴ Robert Koch-Institut, Berlin

Keywords: EPEC, probiotics, *E. coli* Nissle 1917, F1C fimbria, porcine

The probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN; O6:H1:K5) is thought to be effective in the treatment of intestinal disorders caused by various pathogenic bacteria. Recently, *in vitro* studies described strong inhibitory effects of EcN on adhesion and/or invasion of intestinal pathogenic bacteria.

In this study we determined the ability of EcN to influence host cell infection by enteropathogenic *E. coli* (EPEC), an important diarrheogenic pathogen in humans and animals, in an *in vitro* porcine intestinal epithelial cell model (IPEC-J2). We focused our attention on a detailed phenotypic description of alterations in single steps of EPEC infection such as adherence and the formation of micro-colonies, as well as attaching and effacing lesions. Pre-incubation of IPEC-J2 with EcN was found to drastically reduce the infection efficiency of EPEC in a concentration dependent manner, suggesting EcN interferes with early interactions of EPEC with host cells. While attachment and formation of micro-colonies was reduced, adherent bacteria still formed attaching and effacing lesions.

Further studies revealed that EcN adherence to porcine epithelial cells is largely mediated via F1C fimbria. This adhesion mediates the probiotic effect since a non-adherent EcN μ foc mutant did not reduce EPEC infection. A commensal *E. coli* wild type strain lacking F1C fimbriae and not showing strong adherence or a probiotic effect showed strong adhesion and an inhibitory effect on EPEC infection after introduction of a complementing plasmid harbouring the *foc* gene cluster. In addition to F1C fimbriae, we showed that EcN flagellae are also involved in the adhesion process. The H1 flagellae of EcN forms a bacterial network on the host cell surface. A non-flagellated EcN μ fliA mutant showed reduced adhesion to the host cell surface and a reduced capacity to inhibit EPEC infection. In conclusion, the inhibitory effect of EcN on the infection of porcine intestinal epithelial cells with EPEC is mediated by its adherence via F1C fimbriae and H1 flagellae.

II. Nachweis, Virulenzfaktoren und Typen enteroaggregativer *Escherichia coli*

Anselm Lehmacher, Jeremie Groos und Maria Hoffmann

Institut für Hygiene und Umwelt, Marckmannstr. 129a, D-20539 Hamburg,
anselm.lehmacher@hu.hamburg.de

Schlüsselwörter: enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC, Fimbrien, Serinprotease

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) gelten als häufige Verursacher von lebensmittelbedingter Enteritis, Durchfallerkrankungen im Zusammenhang mit Unterernährung in der 3. Welt, persistierender Diarrhö von Kindern, Reisediarrhö und Enteritis von AIDS-Patienten. EAEC sind durch ihr aggregatives Verhalten im Zellkulturtest charakterisiert. EAEC weisen in Versuchen mit freiwilligen, gesunden Erwachsenen eine heterogene Virulenz auf. Nach der DNS-Probe pCVD432 für das *aatA*-Gen des EAEC-Virulenzplasmids wurden in den letzten Jahren mögliche Virulenzgene verschiedener EAEC-Stämme beschrieben. Sie umfassen neben *aatA* zur Biofilmbildung beitragenden Fimbriengene wie *aggA*, *aafA* und *aag3A*, die Fimbrien- und Biofilmbildung regulierenden Gene *aggR* und *aap*, den Adhärenzfaktor *tia*, mögliche Enterotoxingene wie *astA*, *pet* und *set1* sowie das Mucinase- und Hämagglutinin *pic/she*.

Der Vergleich von 28 EAEC-Isolaten aus Enteritis-Patienten, davon 18 unter 6 Jahren, und *E. coli*-Isolaten 100 gesunder Kleinkinder zeigte, dass die Aggregation im Zellkulturtest und die Gene *astA*, *pet*, *set1*, *pic/she* und *tia* ebenfalls häufig unter den *E. coli*-Isolaten symptomloser Kleinkinder nachzuweisen sind. Überraschenderweise wurden aus den Stuhlproben der gesunden Kinder 6 pCVD432-positive *E. coli* isoliert, die sich nicht signifikant hinsichtlich ihres Virulenzgenmusters von den EAEC der Enteritis-Patienten unterschieden. Diese 6 Isolate und die EAEC-Patientenisolate unterscheiden sich durch die Fimbriengene *aggA*, *aafA* und *aag3A* sowie die Regulationsgene *aggR* und *aap* von den Isolaten der symptomlosen Kleinkinder. Unter den EAEC-Patientenisolaten fanden sich insbesondere O-Serogruppen, die aktuell oder früher zu denen der säuglingpathogenen *E. coli* gezählt werden.

Auf fast allen EAEC-Virulenzplasmiden fanden wir neben diesen Genen auch das *sepA*-Gen einer sezernierten Serinprotease. Das EAEC-Gen zeigt eine hohe Identität zu dem einiger Shigellen und enteroinvasiver *E. coli*. Nach Klonierung von *sepA* aus einem EAEC-Isolat wurde das exprimierte Protein charakterisiert. Die 110 kDa-Protease baut markiertes Casein ab und ihre Aktivität wird durch zweiwertige Metallionen gesteigert. Die Protease wird durch Inhibitoren des Serins im aktiven Enzymzentrum und Metallchelatoren gehemmt.

Typische EAEC sind charakterisiert durch die Pathogenitätsgene eines Virulenzplasmids. Der PCR-Nachweis dieser Gene ist nach einer Anreicherungskultur im Vergleich zum Zellkulturtest weniger laborintensiv und von höherer Spezifität. Mit diesen Nukleinsäurenachweisen könnten zukünftig die Fragen nach der Pathogenität von EAEC und der Möglichkeit der Übertragung durch Lebensmittel bearbeitet werden.

III. Genomvariabilität, Evolution und Pathogenese extraintestinal pathogener *Escherichia coli* (ExPEC)

Sören Schubert, Friederike Feldmann, Andreas Wieser, Orsolya Bendek, Kirsten Weinert, Johanna Sorsa

Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Marchioninistr. 17, 81377 München

Infektionskrankheiten gehören weltweit immer noch zu den häufigsten Todesursachen und auch in Deutschland verursachen Infektionen nach Herz-Kreislaufkrankungen und Krebserkrankungen die meisten Todesfälle. Hierbei zählen extraintestinal pathogene *Escherichia coli* (ExPEC) zu den führenden bakteriellen Infektionserregern und sind häufigste Ursache insbesondere nosokomialer Infektionen. Aber auch im ambulanten Bereich verursachen ExPEC eine Vielzahl von Erkrankungen, wie Harnwegsinfektionen, Septikämien, Wundinfekte und Hirnhautentzündungen. Im Infektionsprozess wichtige Virulenzfaktoren von ExPEC sind fimbrielle Adhäsine (Typ1-, P-, S-Fimbrien), Toxine (Hämolsine, CNF), Invasine und bakterielle Eisenaufnahme-Systeme (Siderophor-Systeme). Im Unterschied zu den intestinal pathogenen *E. coli* (EPEC, EHEC, EIEC, ETEC und EAEC) besitzen ExPEC keinen kardinalen Virulenzfaktor oder einzelne Virulenzfaktoren. Vielmehr sind bei ExPEC eine Vielzahl von Virulenzdeterminanten oder virulenzassoziiierenden Faktoren beschrieben, die in unterschiedlicher Zusammensetzung bei klinischen Isolaten nachgewiesen werden können. Diese Faktoren sind als genetische Zusatzausstattung auf mobilisierbaren Elementen wie Bakteriophagen, Plasmiden und vor allem auf genomischen Inseln (Pathogenitätsinseln, PAIs) lokalisiert und wurden durch horizontalen Transfer von anderen Spezies auf *E. coli* übertragen, bzw. sind immer noch übertragbar. Wenngleich auch die exakten Mechanismen der Übertragung solcher Pathogenitätsinseln von ExPEC immer noch weitgehend unbekannt sind, kann am Beispiel einer hochkonservierten genomischen Insel, der sog. „High-Pathogenicity Island“, die Mobilisierung und der Transfer dargestellt werden. Die Evolution der ExPEC-Virulenz ist als genomische Flexibilität (Akquisition und Verlust genomischer DNA) vor dem genomischen Hintergrund der *E. coli*-Spezies zu sehen. Interessanterweise sind ExPEC-Isolate nahezu ausschließlich auf zwei der klonalen phylogenetischen Gruppen (B2 und D) beschränkt, deren Isolate eine Vielzahl genomischer Virulenzdeterminanten tragen und entsprechend ca. 1 Mio bp größere Genome besitzen. Neben dem vertikalen (klonalen) Transfer der Virulenzfaktoren innerhalb einer phylogenetischen Gruppe sind horizontale Transfer-Ereignisse innerhalb der *E. coli* Spezies und zwischen *E. coli* und anderen Spezies für die Diversität der Virulenzfaktoren bei ExPEC verantwortlich. Das Wissen um die komplexe Virulenzgen-Komposition bei ExPEC lässt neue diagnostische Verfahren zu, um beispielsweise ExPEC im Darm von Risikopatienten zu identifizieren oder das ExPEC-Virulenzpotenzial von Isolaten zu klassifizieren (diagnostische DNA-Microarrays, „Pathoarrays“). Die Identifikation von ExPEC-Virulenzgenen kann überdies neue Wege der Prävention eröffnen, wie etwa die Einführung von Vakzinierung gegen Virulenzfaktoren. Auf diese Weise sollten diese weltweit verbreiteten, bedeutsamen Infektionen zukünftig noch besser beherrscht werden können.

E. Pathogenitätsfaktoren

I. Vergleich der Genomstrukturen von EHEC

H. Karch et al., Münster

II. Interaction of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) pathogenicity factors with the human complement system – Evidence for a pathogenic role of complement in EHEC induced haemolytic uraemic syndrome

R. Würzner et al., Innsbruck

III. Charakterisierung der NleA-Familie von Typ III Effektoren bei verschiedenen Serogruppen pathogener Escherichia coli

K. Kreuzburg et al., Stuttgart

I. Vergleich der Genomstrukturen von EHEC

Helge Karch

Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster

Schlüsselwörter: Kerngenom, Genominseln, Genvariabilität

Durch Array-Analysen, DNA-Sequenzierungen und subtraktive Hybridisierung wurden Genomvergleiche zwischen 24 EHEC-Stämmen (u. a. Sorbit-fermentierende O157:H⁻, O26:H11, O111:H8, O103:H2, O91:H⁻) und zwei apathogenen *E. coli*-Laborstämmen durchgeführt. Beim Vergleich der Genome zeigte sich, dass diese aus einem relativ konstanten, ca. 3.6 Mb großen Teil (Kerngenom), und einem flexiblen Bereich bestehen. Die Größe der Genome der EHEC-Stämme ist unterschiedlich und reicht von 4.85 Mb bis 5.50 Mb. Alle EHEC-Stämme haben somit größere Genome als die beiden *E. coli* Laborstämmen (4.60 Mb). Bei einem Teil der Stämme wurde der flexible Genomteil analysiert. Er besteht aus Phagen und Plasmiden sowie Genominseln (Pathogenitäts- und Fitnessinseln), die in tRNA-Genen integriert sind. Einige der hierbei identifizierten DNA-Bereiche kodieren potenzielle Pathogenitätsfaktoren, die bisher in EHEC O157:H7 noch nicht beschrieben worden sind. Die vergleichenden Genomanalysen von EHEC unterschiedlicher Serovare erlauben Rückschlüsse auf die Evolution dieser Krankheitserreger und zeigen, wie durch horizontalen Gentransfer neue und besonders virulente Varianten entstehen können. Die hier identifizierten DNA-Sequenzen sollen verwendet werden, um einen neuen DNA-Array zu etablieren, der alle bis heute identifizierten EHEC-spezifischen Gene enthält. Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten eines solchen Arrays werden diskutiert.

II. Interaction of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) pathogenicity factors with the human complement system – Evidence for a pathogenic role of complement in EHEC-induced haemolytic uraemic syndrome

Dorothea Orth, Katharina Grif, Sonja Fidanzi, Abdul-Basit Khan, Asma Naim, Manfred P. Dierich, Lothar-Bernd Zimmerhackl*, *Reinhard Würzner*

Austrian Reference Laboratory for EHEC at the Department of Hygiene, Microbiology and Social Medicine and *Department of Paediatrics, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

Keywords: EHEC, HUS, complement

Infections with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) represent a major cause for haemolytic uraemic syndrome (HUS) and acute renal failure in childhood. Shiga toxins (Stx1 and Stx2) are believed to be major virulence factors of EHEC, contributing to the pathogenesis of HUS. However, other potential virulence factors, like the serine protease EspP, are discussed.

Besides EHEC-associated HUS, there are hereditary forms of HUS, which are caused by mutations of complement regulator proteins, in particular factor H, and not dependent on EHEC bacteria. In contrast, a direct action of Shiga toxins on renal cells has been proposed for development of the EHEC-associated HUS.

The aim of our study was to investigate whether complement is also involved in the pathogenesis of diarrhoea associated/EHEC-induced HUS.

By measuring the Terminal Complement Complex (TCC) using an ELISA based on a neoepitope on human C9 we could show that purified Shiga toxin 2 reproducibly activates complement twice as high as heat inactivated Shiga toxin 2 when incubated with normal human sera in fluid phase in vitro.

To determine the activation pathway involved the TCC concentration was measured in normal human serum after incubation with purified EspP and the chelating substances EDTA and EGTA. Complement activation was abolished by adding EDTA to EspP. In contrast, co-incubation of EspP with EGTA and MgCl₂ only partially impaired complement activation, suggesting that EspP activates complement predominantly via the alternative pathway.

In conclusion, EHEC virulence factors Shiga toxin and EspP activate complement in vitro, suggesting that complement also plays a role in EHEC-induced HUS. Our hypothesis is that EHEC virulence factors exert their destructive action via complement.

III. Charakterisierung der NleA-Familie von Typ III Effektoren bei verschiedenen Serogruppen pathogener *Escherichia coli*

Kristina Creuzburg, Sabine Stingel und Herbert Schmidt

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Universität Hohenheim, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) und enteropathogene *E. coli* (EPEC) können mithilfe eines Typ III Sekretionssystems (T3SS) Effektorproteine aus dem bakteriellen Zytoplasma in eukaryotische Zellen translozieren. Diese Effektoren verändern den Metabolismus der Wirtszelle und tragen so zur Virulenz von EHEC und EPEC bei. Das T3SS und verschiedene Effektoren werden von einer chromosomalen Pathogenitätsinsel, dem „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) kodiert. Die Gene weiterer Effektoren treten insbesondere in Assoziation mit Phagen-DNA im Bakteriengenom auf. Dies gilt ebenfalls für Vertreter der NleA-Familie von Typ III Effektoren. So ist die Variante *nleA*₄₇₉₅ im Genom des Shiga Toxin 1-konvertierenden Bakteriophagen BP-4795 lokalisiert. Die Funktion von NleA ist bislang unbekannt. Jedoch zeigt dieses Effektorprotein nach Translokation in HeLa-Zellen eine Lokalisation innerhalb des Trans-Golgi Netzwerkes.

Die Verbreitung des Gens *nleA* wurde in 170 EHEC und EPEC Isolaten verschiedener Serogruppen untersucht. Es wurden drei bereits bekannte und elf neue Varianten von *nleA* in 149 überprüften Stämmen identifiziert, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen eine Übereinstimmung von 71% bis 96% aufweisen. Insbesondere Deletionen oder Insertionen von vier bis 51 Aminosäuren im Mittelteil der abgeleiteten Proteine sind für diese Sequenzunterschiede verantwortlich. Etwa ein Viertel dieser *nleA*-positiven Stämme tragen zwei Kopien dieses Gens in ihrem Genom, wie Southern-Blot Hybridisierungen zeigten. Überwiegend erwiesen sich diese Kopien als zwei unterschiedliche Varianten des Gens *nleA*. In fast allen Fällen kommen in einer dieser Varianten Punktmutationen oder Insertionen eines IS-Elementes vor, die auf ein verkürztes und somit vermutlich nicht funktionelles Protein hinweisen. Mithilfe von Plaque-Hybridisierungen wurden verschiedene Varianten des Gens *nleA* im Genom induzierbarer Bakteriophagen nachgewiesen. Diese Phagen konnten in einen *E. coli* Laborstamm transduziert werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten auf eine Assoziation bestimmter Varianten des Gens *nleA* mit spezifischen *E. coli* Serogruppen und eine Verbreitung des Gens *nleA* durch horizontalen Gentransfer hin.

F. Wirt-Erreger-Interaktionen

- I. **Glykosphingolipide vaskulärer Endothelzellen: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren**
J. Müthing et al., Münster
- II. **Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen**
C. Schweppe et al., Münster

I. Glykosphingolipide vaskulärer Endothelzellen: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren

Johannes Müthing¹ und Helge Karch²

¹Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 31, D-48149 Münster; jm@uni-muenster.de

²Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster

Schlüsselwörter: Stx1, Endothelzellen, Gb3Cer/CD77

Mikrovaskuläre Endothelzellen aus menschlichem Gehirn (human brain microvascular endothelial cells, HBMECs) und EA.hy 926-Zellen, die durch Fusion einer humanen Epithelzelllinie mit Nabelschnurendothelzellen gewonnen wurden, werden weltweit als Zielzellen für pathogene Bakterien und deren Toxine sowie als Zellkulturmodelle für Entzündungsreaktionen und Angiogenesestudien eingesetzt. Obwohl die Bedeutung von Glykosphingolipiden (GSL) als Zellrezeptoren für viele Pathogene und Toxine bekannt ist, weiß man nichts über die GSL der beiden Zelllinien.

Erste vergleichende Zytotoxizitätstests hatten ergeben, dass HBMECs eine geringe und EA.hy 926-Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber Shiga Toxin (Stx) 1 besaßen. Die unterschiedlich starke Zellschädigung durch Stx1 konnte weiterhin mittels Raster-Elektronenmikroskopie von auf Microcarriern gewachsenen Zell-Monolayern und digitaler Holografie-Mikroskopie von Einzelzellen nachgewiesen werden. GSL der Globo-Serie sind die zellulären Rezeptoren für Stx, wobei Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77) als Rezeptor für Stx1 bisher am intensivsten untersucht worden ist. Es wurde postuliert, dass die unterschiedliche Stx1-Sensibilität von HBMECs und EA.hy 926-Zellen auf einer unterschiedlichen Expression von Gb3Cer beruht.

Immunfluoreszenzmikroskopische Färbungen ergaben eine moderate Expression von Gb3Cer und Gb4Cer in HBMECs, aber eine höhere Konzentration an Gb3Cer und das Fehlen von Gb4Cer in EA.hy 926-Zellen. Dünnschichtchromatografische Analysen der GSL-Komposition beider Zelllinien bestätigten die mikroskopischen Resultate. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass EA.hy 926-Zellen die für die Gb4Cer-Biosynthese verantwortliche $\uparrow$ 1,3-GalNAc-Transferase (Gb4Cer-Synthetase) fehlt, was offensichtlich zur Akkumulation von Gb3Cer und erhöhten Stx1-Sensitivität führt. Abschließend erfolgte dann die strukturelle Feincharakterisierung der verschiedenen Gb3Cer-Varianten mittels Tandem-Massenspektrometrie. Während HBMECs eine äquimolare Verteilung von Gb3Cer-Spezies mit kurz- und langkettigen Fettsäuren aufweisen, dominieren in EA.hy 926-Zellen die Gb3Cer-Varianten mit langkettigen Fettsäuren. Inwieweit diese Unterschiede eine funktionelle Bedeutung für die unterschiedliche Stx1-Sensitivität der beiden Zelllinien haben, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

Die Bindung von Stx an Globo-Serie GSL des mikrovaskulären Endothels gilt als das primäre histopathologische Ereignis bei STEC-Infektionen, das zu schwerwiegenden Erkrankungen beim Menschen führt (hämorrhagische Kolitis, hämolytisch urämisches Syndrom). Die Aufklärung des initialen Mechanismus der Stx-Endothel-Interaktion dient daher nicht nur dem Erkenntnisgewinn des Mediziners und Naturwissenschaftlers, sondern sollte zur Entwicklung therapeutischer Konzepte gegen STEC-assoziierte Erkrankungen beitragen.

II. Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen

Christian H. Schweppe¹, Martina Bielaszewska¹, Helge Karch¹, Jasna Peter-Katalinić² und Johannes Mühling²

¹Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster

²Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 31, D-48149 Münster; jm@uni-muenster.de

Schlüsselwörter: Stx1, Endothelzellen, Gb3Cer/CD77, HPTLC, ESI Q-TOF-MS

Die Kombination massenspektrometrischer Techniken mit immunologischen Nachweismethoden stellt ein elegantes Verfahren dar, das die vollständige Strukturauflösung von Glykosphingolipiden (GSL) ermöglicht. GSL-spezifische Antikörper oder Toxine liefern die strukturelle Information über den Oligosaccharidtyp eines GSLs, während sich die Monosaccharidsequenz des Oligosaccharids und die Zusammensetzung des Ceramidanteils (Sphingosin plus Fettsäure) exakt mithilfe der Massenspektrometrie bestimmen lassen. Mittels Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie (high-performance thin-layer chromatography, HPTLC) getrennte GSL der Globo-Serie können mit dem Shiga Toxin (Stx) 1 sowie einem Anti-Stx1-Antikörper und dem zugehörigen enzymmarkierten Sekundärantikörper analog dem ELISA-Verfahren auf der Kieselgelplatte detektiert werden. Nach Extraktion der GSL aus immungefärbten HPTLC-Banden ermöglicht die Elektrospray Ionisations Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (electrospray ionisation quadrupol time-of-flight mass spectrometry, ESI Q-TOF-MS) in Verbindung mit der Tandem-MS deren vollständige Strukturaufklärung, wobei die letztgenannte Technik die Erzeugung von Fragmentierungsspektren von selektierten Molekülonen erlaubt.

Es wurden die GSL aus mikrovaskulären Endothelzellen des menschlichen Gehirns (human brain microvascular endothelial cells, HBMECs) und aus makrovaskulären EA.hy 926-Zellen (einem Abkömmling von humanen Nabelschnurendothelzellen, human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) isoliert. Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77) repräsentiert den „high-affinity receptor“ von Stx1, der von beiden Zelllinien exprimiert wird. Nach Immundetektion wurden die HPTLC-getrennten Stx1-Rezeptoren aus dem Kieselgel extrahiert und die Strukturen der verschiedenen Gb3Cer-Spezies mittels ESI Q-TOF-MS ermittelt. Die als Doppelbanden chromatografierenden GSL zeigten Variabilität hinsichtlich der Fettsäure im Ceramidteil (C16- bis C24-Fettsäuren), wohingegen der langkettige Aminoalkohol (Sphingosin, d18:1) bei allen Gb3Cer-Varianten konstant war. Am Beispiel von Stx1-detektiertem Gb3Cer (d18:1, C24:0) und Gb3Cer (d18:1, C16:0) wird deren vollständige strukturelle Charakterisierung mittels Tandem-MS demonstriert. Im Positiv-Ionen-Modus erzielte Oligosaccharid-Fragmentationen der B- und C-Serie sowie GSL-Fragmentationen der Y- und Z-Serie liefern zusammen mit der Stx1-Bindungsspezifität die Totalstruktur der Rezeptoren. Während HBMECs eine äquimolare Verteilung von Gb3Cer-Spezies mit kurz- und langkettigen Fettsäuren aufweisen, dominieren in EA.hy 926-Zellen die Gb3Cer-Varianten mit langkettigen Fettsäuren.

Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Stx1-Rezeptoren von HBMECs und EA.hy 926-Zellen in ihrer Feinstruktur signifikant unterscheiden. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, inwieweit diese Unterschiede einen Einfluss auf die unterschiedliche Stx1-Sensitivität der beiden Zelllinien haben.

B.

POSTER

Poster

Epidemiologie

- I. **Bedeutung von Sorbit-fermentierenden E. coli O157:H- als Krankheitserreger**
A. Friedrich et al., Münster
- II. **Untersuchungen zu räumlichen und zeitlichen Zusammenhängen von potentiellen EHEC des Serovars O26:H11 isoliert in deutschen Rinderbeständen**
L. Geue et al., Wusterhausen

EHEC und Lebensmittel

- III. **Evaluierung des RIDASCREEN[®] Enzym-Immunoassays zum Nachweis von Shiga (Vero) Toxin bildenden Escherichia coli Stämmen verschiedener Herkunft**
L. Beutin et al., Berlin
- IV. **Subtypisierung von Shiga Toxin produzierenden STEC mittels Schmelzkurvenanalyse**
A. Bischoff et al., Oberschleißheim
- V. **Untersuchung von EHECs aus humanen Stuhlproben auf das Vorhandensein des für ein neuartiges Zytotoxin kodierenden *subAB* Gens**
U. Busch et al., Oberschleißheim
- VI. **Use of DNA microarrays for the detection and characterisation of pathogens: Development of a microarray for the analysis of virulence and virulence associated genes in STEC / VTEC**
M. Kuhn et al., Berlin
- VII. **Reaktivität von Stx1, Stx2 und deren Varianten mit monoklonalen Antikörpern**
K. Paul et al., Münster
- VIII. **"Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT" von INSTAND e.V.: Externe Qualitätskontrolle in der molekularbiologischen EHEC-Diagnostik**
U. Reischl et al., Regensburg
- IX. **Untersuchungen von humanen Stuhlproben und Umgebungsproben auf EHEC im Jahre 2006 in Bayern**
C. Schreiber et al., Oberschleißheim
- X. **Entwicklung einer hochsensitiven Immuno-PCR zum Nachweis von Shiga Toxinen**
W. Zhang et al., Münster
- XI. **Prevalence of STEC in swiss raw milk cheeses collected at retail level**
C. Zweifel et al., Zürich

EHEC-Reservoir Tier

- XII. Virulenz- und Fitnessgene bei Stx2e-bildenden Escherichia coli aus Schweinen in Deutschland**
S. Barth et al., Gießen
- XIII. Verbreitung shigatoxinogener Escherichia coli in Milchviehbetrieben Schleswig-Holsteins**
A. Menrath et al., Kiel
- XIV. Identifizierung mesenchymaler Zellen aus bovinen Kolonkrypten als Zielzellen für Shigatoxin 1 von Escherichia coli**
M. Mohr et al., Gießen
- XV. Shiga toxin Stx2d (activatable) in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter**
S. Nitzsche et al., Zürich
- XVI. Fallbericht: Eine Hauskatze als Ausscheider von EHEC**
S. Schraner et al., Landshut
- XVII. Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in dairy calves**
L. H. Wieler et al., Berlin

Andere E. coli Pathovare

- XVIII. Prävalenz von enteropathogenen Escherichia coli (EPEC) in Lebensmitteln**
M. Garcia Diez et al., Oberschleißheim
- XIX. Occurrence of "pathoadaptive mutations" in the cadBA operon in several intestinal E. coli**
J. Jores et al., Berlin
- XX. Virulenzfaktoren enteroaggregativer E. coli (EAEC) aus humanen Isolaten**
R. Prager et al., Wernigerode
- XXI. Untersuchung von humanen Stuhlproben und Lebensmittelproben auf verschiedene Pathovare (EHEC, ETEC, EIEC) von Escherichia coli in Bayern**
J. Westermann et al., Oberschleißheim

Pathogenitätsfaktoren

- XXII. Phänotypische und genotypische Charakterisierung von enterohämorrhagischen Escherichia coli O26**

M. Bielaszewska et al., Münster

- XXIII. Proteinchemische und molekularbiologische Charakterisierung der Serinprotease EspP**

J. Brockmeyer et al., Münster

Wirt-Erreger-Interaktionen

- XXIV. Dünnschichtchromatografische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen**

J. Betz et al., Münster

- XXV. Etablierung eines Bakterien-Adhäsionstests zur strukturellen Charakterisierung von E. coli-bindenden Glykosphingolipiden mittels Massenspektrometrie**

A. Müsken et al., Münster

Sonstige

- XXVI. Transcriptional regulation of the adherence / lymphocyte inhibitory factor efa1 / lifA gene of an enterohaemorrhagic E. coli strain**

U. Böhnke et al., Berlin

- XXVII. In vitro effect of release/production of Shiga toxin (Stx) by different serogroups of VTEC following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents**

K. Grif et al., Innsbruck

- XXVIII. Langzeitausscheider von EHEC – Probleme und Konsequenzen**

F. Oberparleiter et al., Roth

- XXIX. Charakterisierung NleA-kodierender Bakteriophagen von enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC)**

S. Stingel et al., Stuttgart

I. Bedeutung von Sorbit-fermentierenden *E. coli* O157:H⁻ als Krankheitserreger

A. Friedrich, Martina Bielaszewska, Wenlan Zhang, Alexander Mellmann, Helge Karch

Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

Sorbit-fermentierende (SF) EHEC O157:H⁻ sind verantwortlich für ca. 15 % der bakteriologisch bestätigten Fälle von Hämolytisch-Urämischem Syndrom (HUS) in Deutschland. In den vergangenen Jahren sind SF EHEC O157:H⁻ auch in anderen Ländern Europas und Australien nachgewiesen worden. Entscheidende Merkmale, wie das natürliche Reservoir, der Übertragungsweg und die Ursache für die erhöhte Virulenz sind bisher ungeklärt. SF EHEC O157:H⁻ unterscheiden sich genotypisch, phänotypisch, in ihrer Epidemiologie und der klinischen Bedeutung deutlich von den klassischen EHEC O157:H7. Die phänotypische Besonderheit, Sorbit zu fermentieren, führt dazu, dass sie auf den in den angelsächsischen Ländern empfohlenen Sorbit MacConkey Agar nicht identifiziert werden können. SF *E. coli* O157:H⁻ tragen ebenso wie die nicht Sorbit-fermentierenden (NSF) *E. coli* O157:H7 große Virulenzplasmide (pSFO157), deren Virulenzausstattung von dem der Plasmide der NSF *E. coli* O157:H7 abweicht. So konnte die A-Untereinheit des plasmidkodierten Fimbriengencuster (*sfpA*) als diagnostisches Target dazu genutzt werden, SF EHEC O157:H⁻ schnell und direkt aus klinischen Stuhlproben nachzuweisen. Für die vorliegenden Untersuchungen haben wir 48 SF *E. coli* O157:H⁻ aus 1329 klinischen Stuhlproben nachweisen können. Die mittlere Nachweiszeit lag bei 18-24 h. Der Nachweis des *sfp* Genclusters war signifikant mit dem Auftreten eines HUS assoziiert. Des Weiteren führten wir eine Analyse durch, die 440 *Escherichia coli*, u.a. STEC, EHEC und die Referenzstammsammlung ECOR umfasste. Wir konnten zeigen, dass in 0 von 82 SF O157:H⁻ das Urease Gencluster (*ureC*) nachweisbar war. Im Gegensatz hierzu war bei non-O157 STEC und NSF *E. coli* O157:H7 das *ureC* in unterschiedlicher Häufigkeit nachweisbar. Bei 1% der untersuchten Isolate der Serogruppen NSF *E. coli* O157:H7 und O26 konnte phänotypisch eine Urease-Produktion nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich SF O157:H⁻ durch den Nachweis chromosomaler und plasmidkodierter Virulenzgene von NSF *E. coli* O157:H7 unterscheiden. Der Nachweis von *sfpA* ist signifikant mit HUS assoziiert. Auch wenn die Bedeutung für die Ursache für die erhöhte Virulenz und die unterschiedliche Epidemiologie von SF *E. coli* O157:H⁻ nicht endgültig geklärt ist, hat sich im klinischen Labor der Nachweis von Virulenzgenen als spezifische und sensitive Screening- und Differenzierungsmethode von SF O157:H⁻ aus Patientenstühlen bewährt.

II. Untersuchungen zu räumlichen und zeitlichen Zusammenhängen von potentiellen EHEC des Serovars O26:H11 isoliert in deutschen Rinderbeständen

Lutz Geue, Sabrina Klare, Susann Schares, Birgit Mintel, Franz J. Conraths

Friederich-Loeffler Institut, Institut für Epidemiologie Wusterhausen, Seestrasse 55, 16868 Wusterhausen

Zielsetzung: Die räumlichen und zeitlichen Zusammenhänge von 54 potentiellen EHEC-Isolaten des Serovars O26:H11, die während eines dreijährigen Monitoringprogramms in drei unterschiedlichen deutschen Rinderbeständen isoliert worden waren [1], wurden mit molekular-epidemiologischen Methoden charakterisiert.

Methode: Mittels PCR, PCR-RFLP, Koloniehybridisierung bzw. Real-Time-PCR wurden eine Reihe von Genen (*stx*, *fliC*, *eae*, *tir*, *espA*, *espB*, *hly_{EHEC}*, *lifA*) typisiert bzw. subtypisiert. Die Produktion von Shiga-Toxinen wurde im Verozell-Neutralisationstest sowie im ELISA geprüft. Plasmid-Profil-Analyse sowie Makro-RFLP-Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese nach Restriktionsspaltung mit vier Enzymen (*Xba I*, *Not I*, *Bln I* und *Spe I*) wurden durchgeführt. Die genetische Distanz zwischen den Isolaten wurde unter Verwendung des Dice-Coeffizienten berechnet, eine Cluster-Analyse der Distanz-Matrix wurde mit Hilfe des UPGMA-Algorithmus realisiert. Die Lokalisation der *stx*-Gene, *eae*-Gene und der *lifA*-Gene wurde in der Southern-Hybridisierung nach PFGE vorgenommen. Eine MLST-Analyse wurde durchgeführt.

Ergebnisse: In allen Isolaten aus Rindern wurden *stx1*-Gene gefunden, in einigen der Stämme wurden zusätzlich *stx2*-Gene nachgewiesen. Alle Intimin-Gene konnten dem Subtyp η -*eae* zugeordnet werden. Ebenfalls dem η -Subtyp gehörten alle *tir*-, *espA*- und *espB*-Gene an. Mit der *fliC*-PCR konnte bestätigt werden, dass alle Isolate dem Serotyp O26:H11 zuzuordnen waren.

Im Unterschied zu den O165:H25-Isolaten, die einem Klon zuzuordnen waren und über einen Zeitraum von 5 Monaten in nur einem Betrieb nachgewiesen werden konnten [2], wurden bei O26:H11 verschiedene Klone identifiziert. Dabei waren die klonalen Unterschiede nicht nur auf räumliche Distanzen zurückzuführen (unterschiedliche Betriebe). Auch innerhalb eines Betriebes wurden O26:H11-Klone während unterschiedlicher zeitlicher Perioden isoliert. Geringe genetische Differenzen konnten auch innerhalb der einzelnen Klone nachgewiesen werden.

Literatur:

- [1] Geue, L.; Segura-Alvarez, M.; Conraths, F.J.; Kuczius, T.; Bockemühl, J.; Karch, H.; Gallien, P. (2002) A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol. Infect.* **129**: 173-185.
- [2] Geue, L.; Selhorst, T.; Schnick, C.; Mintel, B.; Conraths, F.J. (2006) Analysis of the clonal relationship of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O165:H25 isolated from cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 2254-2259.

III. Evaluierung des RIDASCREEN® Enzym-Immunoassays zum Nachweis von Shiga (Vero) Toxin bildenden *Escherichia coli* Stämmen verschiedener Herkunft.

Lothar Beutin¹, Hartmut Steinrück¹, Gladys Krause¹, Katja Steege¹, Sabine Haby¹, Gudrun Hultsch¹, Bernd Appel²

¹Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli*, Zentrum für Infektiologie und Erregercharakterisierung, Diedersorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany,

²Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Abteilung für Biologische Sicherheit

Der Ridascreen[®] Verotoxin Enzym Immunoassay (Ridascreen EIA) ist ein im Laborfachhandel vertriebener, standardisierter Schnelltest zum Nachweis der Produktion von Shiga (Vero) Toxinen (Stx) der Familien Stx1 und Stx2. Dieser Test wird in Deutschland häufig für die Diagnostik in der Humanmedizin und bei Lebensmitteluntersuchungen verwendet. In der vorliegenden Studie wurde der Ridascreen-EIA mit dem Verozelltoxizitätstest und mit einem P₁-Glykoprotein Rezeptor Enzym-Immunoassay zum Nachweis der Produktion, sowie mit stx-spezifischen PCRs zum genetischen Nachweis von Stx verglichen. Für diese vergleichende Untersuchung wurden 43 Referenzstämme Shiga Toxin produzierender *E. coli* (STEC) und 241 aus Lebensmitteln, Wasser und Kotproben isolierte STEC verwendet. Innerhalb der Gruppe der verwendeten Referenzstämme konnten mit dem Ridascreen-EIA die Stx-Varianten Stx1, Stx1c, Stx1d, Stx2, Stx2v-ha, Stx2v-hb, Stx2e, Stx2ev, Stx2d, Stx2d-ount, Stx2-NV206, Stx2f and Stx2g nachgewiesen werden. Der Ridascreen-EIA zeigte eine relative Sensitivität von 96,3% und eine relative Spezifität von 98,7%.

Aus der Gruppe der 241 Teststämme erkannte der Ridascreen EIA deutlich alle Vertreter der Stx1 Familie, wie Stx1 (n=26), Stx1c (n=18) and Stx1d (n=1). In der Gruppe der Stx2 Familie ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. So wurden alle Stx2 (n=14), Stx2v-ha (Stx2c) (n=5) und Stx2v-hb (n=1) Vertreter klar nachgewiesen, dagegen wurden aber einige Vertreter der Stx2-dount (1 von 17), Stx2e (5 von 34) und Stx2g (1 von 7) Varianten nicht erkannt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Ridascreen-EIA prinzipiell geeignet ist, um alle bekannten Varianten der Stx1 und Stx2 Familie nachzuweisen, dass aber bei manchen Stämmen, insbesondere aus den Gruppen Stx2d-ount, Stx2e und Stx2g, die gebildete Toxinmenge offenbar nicht ausreicht, um mit dem Ridascreen-EIA noch nachgewiesen zu werden. Es ist davon auszugehen, dass die falsch-negativen Ergebnisse mit dem Ridascreen-EIA auf einer zu geringen Sensitivität und nicht auf einer mangelnden Spezifität des Tests beruhen. Aufgrund seiner guten Leistung bei der Erkennung der meisten der hier untersuchten Proben ist dieser Test prinzipiell für den Einsatz in der Diagnostik geeignet. Probleme können gegebenenfalls mit schwach Toxin produzierenden Stämmen und mit Mischkulturen entstehen, bei denen nur ein geringerer Anteil von STEC und produziertes Stx vorliegt [1,2].

Literatur:

- [1] Beutin L, Steinruck H, Krause G, Steege K, Haby S, Hultsch G, Appel B. Comparative evaluation of the Ridascreen((R)) Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. J Appl Microbiol. 2007 Mar;102(3):630-9.
- [2] Pulz M, Matussek A, Monazahian M, Tittel A, Nikolic E, Hartmann M, Bellin T, Buer J, Gunzer F. Comparison of a shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. Clin Microbiol. 2003 Oct;41(10):4671-5.

IV. Subtypisierung von Shiga Toxin produzierenden STEC mittels Schmelzkurvenanalyse

A. Bischoff¹, C. Schreiber¹, S. Wolf¹, K. Meindl¹, B. Schalch², A. Sing¹, U. Busch¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

² Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Ludwig-Maximilians-Universität, Oberschleißheim

Shiga Toxin produzierende *Escherichia coli* sind die Ursache für viele gastrointestinale Erkrankungen, von wässrigem bis blutigem Durchfall und hämorrhagischer Colitis (HU) bis hin zum lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischem Syndrom, das in ungefähr 5% der EHEC Infektionen auftritt und mit akutem Nierenversagen, Thrombozytopenie und Anämie einhergeht.

Infektionsquelle für den Menschen ist häufig der direkte und indirekte Kontakt mit infizierten Tieren und Personen, auch kontaminierte Lebensmittel können eine Rolle spielen. Allen STEC gemein ist die Fähigkeit zur Bildung von Shiga Toxinen. Durch Sequenzanalysen wurde nachgewiesen, dass es sich um eine heterogene Gruppe von Zytotoxinen handelt, die sich in zwei Typen, *stx* 1 und *stx* 2, einteilen lässt. Innerhalb dieser Gruppen konnten mehrere Subtypen, *stx*1, *stx*1c, *stx*1d, *stx*2, *stx*2c, *stx*2d, *stx*2e und *stx*2f, differenziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde Vorkommen und Verteilung der *stx*-Subtypen in unterschiedlichen Materialien untersucht. Eine Feintypisierung der Shiga Toxin-Gene ist durch Real-Time-PCR mittels Schmelzkurvenanalyse möglich.

Die Anzucht der Reinkulturen der *stx*-positiven Isolate erfolgte auf Endoagar (37°, 18h). Danach wurden diese Kolonien abgeschwemmt und durch Real-Time-PCR untersucht. Die dabei ermittelten Schmelztemperaturen wurden mit Referenzstämmen verglichen.

Aus Lebensmitteln, Wasser, Trinkwasser und Kot wurden EHEC-positive Reinkulturen isoliert und untersucht. Eine Differenzierung in Subtypen bei 294 Isolaten war möglich, die Ergebnisse werden vorgestellt.

V. Untersuchung von EHECs aus humanen Stuhlproben auf das Vorhandensein des für ein neuartiges Zytotoxin kodierenden *subAB* Gens

U. Busch, A. Sing

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim; Ulrich.Busch@lgl.bayern.de

Den Shiga-Toxinen wird bei der Entstehung der hämorrhagischen Colitis und des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) im Allgemeinen die wichtigste Rolle als Virulenzfaktoren von EHECs (Shiga-Toxin produzierende *Escherichia coli*) zugeschrieben. Dennoch müssen zusätzliche Virulenzfaktoren an der Entstehung des mit diesen Krankheitsbildern assoziierten Endothelschadens beteiligt sein, zumal verschiedene EHEC-Stämme unterschiedlich schwere Krankheitsverläufe auslösen können. Ein kürzlich identifiziertes AB5 Toxin, die zytotoxische Subtilase (SubAB), könnte in Zusammenwirkung mit Shiga-Toxin 1 und/oder 2 an der Entstehung des EHEC-assoziierten Endothelschadens beteiligt sein.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden 50 verschiedene EHEC unterschiedlichen Serotyps, die aus an das LGL zur Diagnostik eingesandten humanen Stuhlproben stammen, mittels PCR auf die Anwesenheit von *subAB*, *stx1*, *stx2*, *eae* und *ehxA* untersucht.

Erste Ergebnisse dieser Studie werden im Rahmen des Workshops vorgestellt.

VI. Use of DNA microarrays for the detection and characterisation of pathogens: Development of a microarray for the analysis of virulence and virulence associated genes in STEC/VTEC

Matthias Kuhn, Ingo Moldenhauer, Maria Landgraf

CONGEN Biotechnologie GmbH, Robert Rössle Str. 10, 13125 Berlin, mk@congen.de

Shiga toxin-producing strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are a prominent cause of acute gastroenteritis, hemorrhagic colitis and the haemolytic-uremic syndrome (HUS) in humans. STEC is an important emerging pathogen. Any strain of STEC is considered to be potentially pathogenic for humans but there is some evidence that differences in virulence potential occur among STEC isolates. In the EU 6th framework project 'PathogenCombat' we are in the process to develop a DNA microarray chip that can monitor the expression of virulence genes of STEC isolates. Additionally probes targeting stress- and adhesion-associated genetic markers are also included on the microarray. The chip will be useful for rapid and more accurate global assessment of the virulence potential of STEC isolates under certain environmental conditions like different food matrices and presence of selected probiotica strains.

Here we report about the status of the development of a microarray to monitor the expression of genes involved in virulence, stress and adhesion of STEC. The project is open to scientific community in order to optimise and harmonise the selection of targets covered by the microarray.

VII. Reaktivität von Stx1, Stx2 und deren Varianten mit monoklonalen Antikörpern

Katja Paul¹, Martina Bielaszewska¹, Alexander W. Friedrich¹, Wenlan Zhang¹, Johannes Müthing² und Helge Karch¹

¹Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster; hkarch@uni-muenster.de

²Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 31, D-48149 Münster

Schlüsselwörter: STEC, Labordiagnostik, Kolonie-Immunoblot

Infektionen durch Shiga Toxin (Stx) produzierende *Escherichia coli* (STEC) können zu einem breiten Spektrum an Erkrankungen führen. Diese reichen von asymptomatischer Trägerschaft und einfacher Diarrhö bis hin zu blutiger Diarrhö und dem hämolytisch urämischem Syndrom (HUS). Ursächlich werden Stx für die mikrovaskuläre endotheliale Schädigung verantwortlich gemacht, welche das primäre histopathologische Ereignis darstellt und als pathophysiologischer Mechanismus der hämorrhagischen Kolitis und dem HUS zugrunde liegt. Stx werden in zwei Familien unterteilt, Stx1 und Stx2, sowie mehrere Varianten (Stx1c, Stx1d, Stx2c, Stx2d_{aktivierbar}, Stx2d, Stx2e und Stx2f). Der Krankheitsverlauf einer STEC-Infektion hängt überwiegend vom Stx-Typ ab, den der an der Infektion beteiligte Stamm produziert. Verschiedene STEC-Stämme sind in der Lage, mehr als einen Stx-Typ zu produzieren.

Eine der wichtigsten Aufgaben der STEC-Labordiagnostik besteht darin, in Nahrungsmittel- oder Stuhlproben zunächst Stx-bildende *E. coli*-Stämme zu detektieren und die pathogenen Erreger zu isolieren. Mit dem Shiga Toxin (Verotoxin)-Kolonie-Immunoblot-Verfahren (SIFIN, Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin; Testkit TS 2110) steht eine Alternative zu der DNA-Kolonie-Hybridisierung zur Verfügung. Die Hauptbestandteile des Testkits sind Syncase Agar (enthält Mitomycin zur Induktion der Stx-Produktion), ein Gemisch aus einem monoklonalen Anti-Stx1- und zwei monoklonalen Anti-Stx2-Antikörpern sowie dem zugehörigen AP-markierten polyklonalen Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper und dem BCIP/NBT-Nachweissubstrat. Der immunologische Nachweis von Stx und die Isolierung Stx-positiver Kolonien erfolgen mit einer dem Agar aufgelegten Doppelmembran: Die Kolonien wachsen auf der oberen Celluloseacetatmembran (Carrier für die Kolonien), während die gebildeten Toxine in die untere Nitrocellulosemembran diffundieren, auf der sie anschließend immunologisch nachgewiesen werden.

Das beschriebene Testverfahren wurde für ein Screening molekularbiologisch und klinisch definierter STEC-Stämme eingesetzt, die Stx1 und Stx2, verschiedene Stx1- und Stx2-Subtypen sowie Kombinationen von Stx-Varianten produzieren. Im Kolonie-Immunoblot als Stx-negativ eingestufte *E. coli* wurden bezüglich ihrer zytotoxischen Aktivität im Verozelltest überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass Stx1, Stx2 und Stx2c-produzierende Stämme zuverlässig detektiert werden können, während die anderen Stx2-Varianten, in Abhängigkeit von ihrer Biosynthese ein positives oder negatives Ergebnis liefern. Es sollte in weiteren Studien geprüft werden, inwieweit die in diesem Testsystem als Stx-negativ klassifizierten Stämme eine klinische Relevanz besitzen.

VIII. "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT" von INSTAND e.V.: Externe Qualitätskontrolle in der molekularbiologischen EHEC-Diagnostik

Udo Reischl¹, Norbert Lehn¹, Hans Wolf¹ und Ulrich Busch²

¹Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg

²Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Gerade in den letzten Jahren haben technische und methodische Fortschritte, wie die Einführung von *real-time* PCR-Verfahren, sowie die vielfältigen Bemühungen zur Standardisierung bestimmter Arbeitsschritte entscheidend dazu beigetragen, dass sich diese Art der Diagnostik von der arbeitsaufwendigen Spezialuntersuchung hin zu einer routinefähigen Untersuchungsmethode entwickeln konnte. Auch wenn dabei methodenbedingt keine Lebend-Tot Unterscheidung der nachgewiesenen Erreger möglich ist und bei vielen Fragestellungen noch umfangreiche Studien zur Beurteilung der positiven und negativen prädiktiven Werte einzelner Testsysteme ausstehen, so kann der Direkt-nachweis und die Differenzierung zahlreicher bakterieller Pathogene oder genetisch determinierter Pathogenitätsfaktoren heute mithilfe der Nukleinsäurediagnostik schnell und zuverlässig aus dem klinischen Probenmaterial bzw. direkt von bewachsenen Kulturen erfolgen.

Innerhalb des renommierten Ringversuchsprogramms von INSTAND e.V. haben wir erstmals im April 2003 und seitdem regelmäßig in halbjährlichem Abstand Ringversuche für den PCR-gestützten Nachweis von EHEC bzw. STEC durchgeführt. Innerhalb der jeweiligen Probensets befinden sich dabei neben den klassischen "Prototyp" EHEC-Stämmen (wie z.B. O157:H7) auch einige Routineisolate aus einer inzwischen sehr umfangreichen Sammlung von unterschiedlichsten *stx*-positiven *E. coli*. Im Rahmen der Ringversuchsauswertung können von den Teilnehmern auch die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt werden.

Wie bei den übrigen bereits langjährig etablierten PCR/NAT-Ringversuchen erfolgt die Anmeldung direkt über die Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e.V. (INSTAND e.V.), Düsseldorf (www.instand-ev.de).

Von der regelmäßigen Teilnahme an den Ringversuchen können diagnostische Laboratorien gleich auf mehrfache Weise profitieren: (I) sie erfüllen formal die Vorgaben von Zertifizierungs- und Akkreditierungsrichtlinien, die eine "regelmäßige Teilnahme an Maßnahmen zur externen Qualitätskontrolle" fordern, (II) bei mehrfach bestandenen Ringversuchen haben Sie eine gewisse Sicherheit hinsichtlich der Zuverlässigkeit ihrer PCR-Protokolle, und (III) nicht oder nur teilweise bestandene Ringversuche liefern in der Regel konstruktive Hinweise auf mögliche Fehlerquellen bei der Nukleinsäureisolierung, der Auswahl der Zielsequenz oder den eingesetzten Amplifikations- oder Detektionsverfahren.

IX. Untersuchung von humanen Stuhlproben und Umgebungsproben auf EHEC im Jahr 2006 in Bayern

C. Schreiber¹, S. Wolf¹, K. Meindl¹, B. Schalch², A. Sing¹, U. Busch¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

² Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Ludwig-Maximilians-Universität, Oberschleißheim

Die meisten Vertreter der Spezies *Escherichia coli* sind apathogene Darmbewohner. Es gibt jedoch einige pathogene Varianten, darunter die enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), die 1983 erstmals bei einem Ausbruch in den USA nachgewiesen wurden und weltweit als Pathogene eine immer größere Rolle spielen. Die EHEC-Stämme produzieren Shigatoxin 1 und/ oder 2, die zyto-, entero- und neurotoxisch wirken. Eine lebensbedrohliche Komplikation des humanen Erkrankungsgeschehens, das von wässrigem Durchfall bis zur hämorrhagischen Colitis variieren kann, stellt das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) dar. Dieses tritt vor allem bei Kleinkindern und älteren Menschen auf. Eine Differenzierung zwischen EHEC und apathogenen *E. coli* erfolgt auf molekularbiologischem Weg.

Im Jahr 2006 wurden am Bayerischen Landesamt (LGL) insgesamt 3862 EHEC-Untersuchungen durchgeführt. Untersucht wurden 3078 humane Stuhlproben, 390 Oberflächenwasserproben, 37 Trinkwasserproben, 207 Lebensmittelproben, 46 Milchproben und 104 Tierkotproben. Die EHEC-Diagnostik erfolgte in Anlehnung an die Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (§ 64 LFGB), durch Anzucht der Bakterien auf Endoagar (37°, 18h) und Analyse der Shigatoxin-Gene mittels Real-Time-PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) nach Abschwemmung der Bakterienkolonien.

Es konnten 154 neue humane EHEC-Infektionen nachgewiesen werden, eine Keimisolierung gelang in 126 Fällen (81,8%). Ein Spektrum von 34 verschiedenen Serotypen wurde detektiert, die häufigsten waren: O103 (6x), O145 (11x), O146 (5x), O157 (5x), O26 (18x), O91 (11x). Weiterhin wurden 57 verschiedene Serovare gefunden, wobei folgende Serovare überwogen: O26: H11 (15x), O145: H- (11x), O91: H- (7x) und O103: H2 (6x).

Von den Lebensmittel- und Milchproben waren insgesamt 14 positiv, von den Trinkwasserproben 4 und von den Kotproben insgesamt 38.

X. Entwicklung einer hochsensitiven Immuno-PCR zum Nachweis von Shiga Toxinen

Wenlan Zhang, Martina Bielaszewska, Alexander W. Friedrich, Helge Karch und Thorsten Kuczius

Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert Koch-Strasse 41, 48149 Münster

Shiga Toxin produzierende *E. coli* (STEC) verursachen eine hämorrhagische Kolitis, aus der sich ein lebensbedrohliches hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) entwickeln kann. Für die schwerwiegenden Krankheitssymptome werden in erster Linie die Shiga Toxine der STEC verantwortlich gemacht. Das Screening auf Shiga Toxine erfolgt in den meisten Routinelaboratorien gegenwärtig mittels Shiga Toxin-Enzyme-Immuno-Assays (EIA). Bekannt ist, dass einige STEC-Stämme sehr geringe Shiga Toxin-Mengen produzieren und damit unterhalb der Nachweisgrenze der konventionellen Toxinnachweisverfahren liegen. Solche Stuhluntersuchungen sind falsch negativ.

Um diese Problematik zu beheben, wurde zur Detektion geringster Mengen an Shiga Toxinen eine neuartige und hochsensitive Nachweismethode, eine sog. Immuno-PCR entwickelt. Bei der Immuno-PCR handelt es sich um die Kombination der konventionellen Antikörper-basierten EIA-Methode mit der PCR, deren Signalverstärkung eine ultrasensitive Detektion von Proteinen und anderen Antigenen ermöglicht. Durch Verstärkung des Signals mithilfe der PCR wird eine 1.000-mal höhere Sensitivität im Vergleich zu konventionellen EIA erreicht.

Insgesamt wurden 31 *stx*₂-positive non-O157 STEC-Stämme mittels eines kommerziellen EIA untersucht. Shiga Toxin konnte bei 25 (81%) Stämmen nachgewiesen werden. Alle sechs (19%) *Stx*-negative und 10 ausgewählte *Stx* positive STEC-Stämme wurden mittels Immuno-PCR untersucht. Bei allen STEC konnte Shiga Toxin nachgewiesen werden. Die Sensitivität der Immuno-PCR lag im Vergleich zum Gennachweis bei 100%.

Aufgrund der hohen Sensitivität empfiehlt sich der Einsatz dieser neuen Methode zum Nachweis von Shiga Toxin aus Stuhlproben und Lebensmitteln im Rahmen der bereits etablierten STEC-Diagnostik.

XI. Prevalence of STEC in Swiss raw milk cheeses collected at retail level

Claudio Zweifel¹, Sandra Schumacher¹, Jürg Danuser², Roger Stephan¹

¹ Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, 8057 Zurich, Switzerland

² Bundesamt für Veterinärwesen, BVET, 3003 Bern

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are among the most important causes of foodborne diseases. They are responsible for a number of human gastrointestinal diseases, including watery or bloody diarrhea, and hemorrhagic colitis (HC). In a proportion of individuals, commonly children, these symptoms may be complicated by neurological and renal sequelae, including hemolytic-uremic syndrome (HUS). The majority of human infections is correlated with the consumption of fecally contaminated food, particularly undercooked ground beef and unpasteurized milk. Public health problems associated with consumption of unpasteurized cow's milk and raw milk products are well documented by recent food-borne infections (Barrett, 1986; Keene et al., 1997; Cody et al., 1999; De Valk et al., 2000; Kalman et al., 2000; De Buyser et al., 2001; Anonymous, 2002).

In this study 405 raw milk cheese samples (soft cheese n=17; semi-hard and hard cheese n=388; all produced from Swiss cow's milk) collected within a national sampling plan at retail level throughout Switzerland during the period of March to December 2006 were analyzed. From each sample, 25 g were enriched in 225 ml brilliant green bile broth (BBL, Cockeysville, Md.) at 37°C for 24 h. The enrichment samples were streaked onto sheep blood agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.; 5% sheep blood Oxoid Ltd., Hampshire, UK), and after incubation at 37°C for another 24 h, the colonies were washed off with 2 ml of 0.85% saline solution. For the STEC assay, 2 µl of each plate eluate were then evaluated by polymerase chain reaction (PCR) with primers based on sequences targeting a region conserved between *stx1* and *stx2* genes.

From PCR positive samples, STEC strains were isolated by colony hybridization. Strains were confirmed as *E. coli* by biochemical properties. By PCR, all strains were examined for the presence of *stx1*, *stx2*, *rfbE*, *eae* and *ehxA* genes.

Of the 405 raw milk cheese samples, 3.5% (14 semi-hard cheeses) were found to be *stx* positive. Non-O157 STEC strains were isolated from five samples. Among these strains, two, five, two and two harbored *stx1*, *stx2*, *stx1* and *stx2*, and *ehxA* genes, respectively. None of the strains tested positive for *eae* (intimin). More cheese samples will be collected in the national sampling plan during the year 2007.

XII. Virulenz- und Fitnessgene bei Stx2e-bildenden *Escherichia coli* aus Schweinen in Deutschland

Stefanie Barth, Reinhard Weiß, Georg Baljer und Rolf Bauerfeind

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere,
Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen

Über den Nachweis von Stx2e-bildenden *Escherichia coli* (STEC-2e)-Stämmen bei an Durchfall oder HUS erkrankten Personen ist sporadisch berichtet worden. Da sich die Isolate von Menschen genetisch und phänotypisch von klassischen porcinen STEC-2e-Stämmen unterscheiden, bestehen Zweifel daran, dass Schweine die Quelle der humanen STEC-2e-Infektionen sind. In der vorliegenden Studie wurde die Frage nach den genetischen Unterschieden aufgegriffen und das charakteristische Fehlen bzw. Vorkommen bestimmter bakterieller Virulenz- und „Fitness“-Gene an einer größeren Sammlung von porcinen STEC-2e-Feldisolaten aus Deutschland (n = 283) überprüft.

Keines der getesteten Isolate besaß außer *stx2e* noch ein anderes *stx*-Gen. Auch Virulenzgene, die bei vielen humanpathogenen *E. coli*-Stämmen beschrieben sind (*eae*, *papC*, *sfaDE*, *afa8*, *ehxA*, *cdtIII*, *cdtIV*, *cnf1/2*, *subA*), waren nicht nachweisbar. Dagegen kamen Gene für schweinespezifische Adhäsionsfaktoren häufig vor, wobei es sich fast ausschließlich um F18-Fimbrien handelte (85,1 %). Bei 14,5 % der Isolate ließen sich keinerlei bekannte Adhäsionsfaktoren nachweisen. Im Gegensatz zu Berichten anderer Untersucher kodierte zudem kein einziger Stamm für die Serinprotease *EspI* (*espI*), während die beiden im „high pathogenicity island“ von *E. coli* lokalisierten Gene *irp2* und *fyuA* bei fünf Isolaten vorlagen. Darüber hinaus besaßen 49,1 % der Isolate Gene für *E. coli*-Enterotoxine. Insgesamt wiesen 42 Isolate (14,9 %) Genprofile auf, die von den in der Literatur für humane STEC-2e-Isolate beschriebenen Profilen nicht zu unterscheiden waren [1]. Die Analyse mit der Triplex-PCR-Methode nach Clermont et al. (2000) ergab, dass die porcinen STEC-2e-Isolate verschiedenen phylogenetischen Gruppen angehörten, wobei die meisten Isolate auf die Gruppen A und D (59,3 % bzw. 38,9 %) entfielen und nur wenige Isolate den Gruppen B1 und B2 (zusammen 1,8 %) zuzuordnen waren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass porcine Stx2e-kodierende *E. coli* eine heterogene Gruppe von Bakterien darstellen, die nicht nur in ihrem Spektrum an horizontal übertragbaren Virulenz- und Fitness-Genen, sondern auch in ihren chromosomalen Eigenschaften eine breite Variabilität aufweisen. Zurzeit sind keine Merkmale bekannt, anhand derer sich ein zoonotisches Potenzial solcher Stämme ableiten oder ausschließen lässt.

Literatur:

- [1] Sonntag, A. K., et al., 2004. J. Clin. Microbiol. 42:954-962.
- [2] Clermont, O. et al., 2000. Appl. Environ. Microbiol. 66:4555-4558.

XIII. Verbreitung shigatoxinogener *Escherichia coli* in Milchviehbetrieben Schleswig-Holsteins

Andrea Menrath und Nicole Kemper

Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
amenrath@tierzucht.uni-kiel.de

Schlüsselwörter: STEC, Rind, Risikoanalyse, Virulenzfaktor, Antibiotikaresistenz

Durch die Umsetzung der EU-Richtlinie 2003/99 wird die Überwachung bedeutender Zoonoseerreger, darunter auch shigatoxinogene *Escherichia coli* (STEC), neu geregelt. Dadurch wird der Bedeutung humanpathogener STEC Rechnung getragen. Als Reservoir und Infektionsquelle gilt der Nutzwiederkäuer, in besonderem Maße das Rind. Der Ansatz einer wirkungsvollen Verhütung von humanen STEC-Infektionen zielt zum einen auf die Optimierung der Lebensmittelhygiene ab, zum anderen aber auch auf die Reduzierung des Erregervorkommens auf der Ebene der Primärproduktion. Damit besteht ein intensiver Forschungsbedarf zur STEC-Prävalenz in rinderhaltenden Betrieben mit dem Ziel, durch Risikoanalyse entsprechende Prophylaxeprogramme zu entwickeln.

Im Rahmen einer Longitudinalstudie wird die Verbreitung von shigatoxinogenen *Escherichia coli*-Stämmen in sechs Milchviehbetrieben in verschiedenen Regionen Schleswig-Holsteins untersucht werden. Die Datenerhebung erfolgt in Form eines monatlichen Monitorings der Stichprobentiere. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt vor dem Hintergrund umfangreicher Daten zur Tiergesundheit, Tierhaltung und Tiergerechtigkeit, die im Rahmen eines vorherigen Projektes erfasst wurden. Zum Teil fließen aktuelle Ergebnisse der Untersuchungen des Landeskontrollverbandes in die Bewertung ein.

Ein Screening der Kotproben erfolgt nach Aufarbeitung mittels PCR [1]. Die Selektion der entsprechenden positiven Isolate findet per Koloniehybridisierung mit DIG-Sonden statt. Eine weitere Subtypisierung wird in Hinblick auf eventuell vorhandene Gene für EHEC-Hämolysin, Intimin, Katalase-Peroxidase und Serinprotease ebenfalls per Koloniehybridisierung durchgeführt [2]. Parallel dazu werden vorhandene Antibiotikaresistenzen geprüft.

Es werden die aktuellen Ergebnisse dieser Studie vorgestellt.

Literatur:

- [1] Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; 27: 2751-7
- [2] Geue L, Segura-Alvarez M, Conraths F J, Kuszius T, Bockemühl J, Karch H, Gallien P. A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. Epidemiol. Infect. 2002; 129: 173-185

Die Studie wird dankenswerterweise von der H. W. Schaumann Stiftung finanziert.

XIV. Identifizierung mesenchymaler Zellen aus bovinen Kolonkrypten als Zielzellen für Shigatoxin 1 von *Escherichia coli*

Melanie Mohr, Ivonne Stamm, Georg Baljer und *Christian Menge*

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität,
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen

Schlüsselwörter:

STEC, Rind, Shigatoxin, Kolon, Fibroblasten, Makrophagen
STEC, cattle, Shiga toxin, colon, fibroblasts, macrophages

Im Darm des Rindes moduliert Shigatoxin 1 (Stx1) von *Escherichia coli* durch seine direkte Wirkung auf Lymphozyten die lokale Immunabwehr. In Primärkulturen boviner Kolonkryptenzellen konnten wir zusätzlich Vimentin-positive mesenchymale Zellen nachweisen, die sich durch eine starke Stx-Rezeptor-Expression auszeichneten. Um die Bedeutung dieser potenziellen Stx1-Zielzellen bestimmen zu können, wurden die Zellen mit dem Plasmid pSVneo3 transfiziert und immortalisiert.

Die durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung ergab, dass die Zellen neben MHC-I auch den Monozyten/Makrophagen-Marker CD14 sowie das auf myeloiden und dendritischen Zellen vorkommende CD172a exprimierten. Untersuchungen mit reverser Realtime-PCR belegten, dass die Zellen bei gleichzeitiger Anwesenheit von LPS auf Stx1 mit einer erhöhten *il-10*-Transkription reagierten. Außerdem induzierte Stx1 die Transkription der Chemokin-Gene *il-8*, *gro-ζ*, *mcp-1* und *rantes*, die sich in Gegenwart von LPS bis zum 70-fachen steigerte.

Bei diesen bislang unbekannten Zielzellen für Stx1 könnte es sich um Fibroblasten oder makrophagen-artige Zellen handeln. Da beide Zellarten durch die Sekretion von Chemokinen wesentlich an der Steuerung der Leukozytenmigration beteiligt sind, könnte Stx1 die Zirkulation der Abwehrzellen lokal beeinflussen und auch durch diese indirekte immunmodulatorische Wirkung die persistierende Kolonisation Stx-bildender *E. coli* im Darm des Rindes erleichtern.

XV. Shiga toxin Stx2d_{activatable} in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter

Sabine Nitzsche¹, Martina Bielaszewska², Helge Karch², Claudio Zweifel¹, Roger Stephan¹

¹Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, 8057 Zurich, Switzerland

²National Consulting Laboratory on Hemolytic Uremic Syndrome, Institute for Hygiene, University of Munster, Munster, Germany.

Pathogenicity of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) is associated with various virulence factors. The main factor is the ability to form different types of exotoxins (Shiga toxins). Shiga toxins can be subdivided into two main groups: Stx1 and Stx2. Characterizations of the *stx*₁ and *stx*₂ genes revealed the existence of different variants in both groups. So far, three *stx*₁ subtypes (*stx*₁, *stx*_{1c}, *stx*_{1d}) and several *stx*₂ variants (e.g. *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f}) have been described. Some STEC produce Shiga toxin in which cytotoxicity is increased (activated) by intestinal mucus and elastase (Stx2d_{activatable}). Bielaszewska et al. (2006) investigated the prevalence of Stx2d_{activatable} among STEC isolated from humans and the association between production of this Shiga toxin and the clinical outcome of infection. Among *eae*-negative STEC, which typically cause mild diarrhea or asymptomatic infections, production of Stx2d_{activatable} was significantly associated with severe disease as bloody diarrhea, and with systemic complications as hemolytic uremic syndrome.

In two previous studies we have isolated 11 strains (cattle n=7; sheep n=4), which were identified as *stx*_{2c}-positive, based on a PCR with primers GK3/GK4 and a subsequent restriction step with *Hae*III. However, according to the recently published paper, an additional PCR and restriction digest is necessary to distinguish *stx*_{2c} from *stx*_{2d-activatable} (Bielaszewska et al., 2006).

Therefore, the aim of this study was (i) to further characterize the Shiga toxin genotypes of these strains and (ii) to determine the serotypes and other virulence factors of these STEC isolated from cattle and sheep.

The strains belonged to 5 O serogroups, 5 H types, and 6 O:H serotypes (O87:H16; O2:H29; O148:H8; O174:H21; ONT:H21; ONT:H). The sheep strains grouped into the serotype O87:H16. By PCR, all strains tested *stx*₁-negative. The majority (n=10) of the strains showed the *stx*_{2d-activatable} genotype, which was confirmed for some strains by an in vitro cell cytotoxicity activation assay. Genes for adhesins as the outer membrane protein intimin (*eae*), a protein essential for the intimate attachment and the formation of A/E lesions on intestinal epithelial cells, or the STEC autoagglutinating adhesin (*saa*), a protein probably of importance in strains negative for the locus of enterocyte effacement (LEE) were not detected. Moreover, all strains tested negative for *ehxA* (enterohemolysin).

Consequently, cattle and sheep seem to be a reservoir for non-O157, *eae*-negative, *stx*_{2d-activatable}-harboring STEC, which may lead in humans to a more severe clinical outcome of the infection compared to other *eae*-negative non-O157 STEC.

XVI. Fallbericht: Eine Hauskatze als Ausscheider von EHEC

S. Schraner¹, S. Hörmansdorfer², K.-H. Boger², U. Busch², A. Sing²

¹ Landratsamt Landshut – Veterinäramt

² Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim und Erlangen

Im Rahmen der epidemiologischen Abklärung einer EHEC-Infektion bei einem Kleinkind wurde auch die im Haushalt lebende Katze der Familie auf die Ausscheidung von EHEC untersucht.

Mittels kulturell-bakteriologischer und molekularbiologischer Verfahren wurden im Kot der Katze Shiga-like Toxin bildende *E. coli* (STEC) nachgewiesen, die geno- und phänotypisch wie folgt charakterisiert wurden:

Serotyp: O 145, Enterohämolysinbildung: pos; Enterohämolysingen (hly): pos; Gen für Shiga-like Toxin 1 (stx₁): positiv; Gen für Shiga-like Toxin 2 (stx₂): positiv; Intimingen (eae): positiv.

Die Katze wurde zwischen Dezember 2004 und Mai 2005 insgesamt dreimal mit positivem Ergebnis auf die Ausscheidung von EHEC untersucht. Alle Isolate wiesen dieselben geno- und phänotypischen Charakteristika auf, die auch mit denen des EHEC-Stamms übereinstimmten, der bei dem erkrankten Kleinkind isoliert worden war. Das Kind war nach Überstehen der Erkrankung im Folgenden erregerfrei.

Die weitere epidemiologische Abklärung bei dem erkrankten Mädchen erbrachte keine anderen möglichen Infektionsquellen als den Kontakt zur eigenen Katze und zu Pferden auf einem Volksfest.

Bei der Katze handelt es sich um eine reine Hauskatze ohne Freigang. Die Fütterung erfolgt ausschließlich mit Fertigfuttermitteln (Dosenfutter und Trockenfutter). Die Katze war während der gesamten Beobachtungsperiode klinisch unauffällig.

Da die Katze über einen längeren Zeitraum diesen EHEC-Stamm ausschied, wurde zunächst ein Behandlungsversuch mit probiotischem Joghurt unternommen, den die Katze auch gerne aufnahm.

Da auf diese Weise ein Sistieren der EHEC-Ausscheidung nicht erreicht werden konnte, wurde durch das LGL aus dem isolierten Stamm eine monovalente, hitzeinaktivierte *E. coli*-Autovakzine hergestellt und der Katze durch den Haustierarzt über 10 aufeinanderfolgende Tage peroral verabreicht. Die Katze nahm dabei 9 der 10 Vakzinedosen auf.

Nach der Behandlung war die Katze EHEC-frei.

Schlussfolgerung:

In vorliegendem Fallbericht wird eine längerdauernde EHEC-Ausscheidung durch eine Katze dargestellt. Es erscheint deshalb sinnvoll, im Zusammenhang mit humanen EHEC Erkrankungen auch den Kontakt zu Katzen oder Hunden vermehrt in die epidemiologischen Überlegungen einzubeziehen. Literaturangaben hierzu sind spärlich.

XVII. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves

L. H. Wieler¹, G. Sobjinski², T. Schlapp³, K. Failing⁴, R. Weiss², Ch. Menge², and G. Baljer²

¹Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, 10115 Berlin, Philippstr. 13, 10115 Berlin, wieler.lothar@vetmed.fu-berlin.de

²Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, 35392 Giessen, Germany

³Essex Animal Health, 30938 Burgwedel, Germany

⁴Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, 35392 Giessen, Germany

Keywords: Diarrhea, calf, *E. coli*, zoonosis, EPEC, EHEC, ETEC

A 12 week-longitudinal study (cohort study) elaborating 1,224 rectal swabs from 221 newborn calves was conducted on 11 dairy farms (i) to ascertain associations between diarrhea and shedding of diarrheagenic *E. coli* and (ii) to facilitate the zoonotic potential assessment of *E. coli* strains shed by young calves. Calves were screened weekly by PCR of swab cultures for shedding of enterotoxigenic *E. coli* [ETEC; by detection of heat stable (*est*) and heat labile enterotoxin genes (*elt*)], diffusely adhering *E. coli* [DAEC; diffuse adhesion (*daa*)], typical enteropathogenic *E. coli* [EPEC; bundle-forming pili (*bfpA*) and intimin (*eae*)] as well as enterohemorrhagic *E. coli* [EHEC, intimin (*eae*) and shiga toxin (*stx*)]. In addition, EHEC-hemolysin- (Hly_{EHEC}-) and alpha-hemolysin- (ζ -Hly-) producing *E. coli* were detected by inoculation of blood agar plates. Within the 221 calves, prevalences were 69.7 % (25.2 % of the 1,224 samples) for Hly_{EHEC}-producing *E. coli*, 55.3 % (19.3 %) for *eae*, and 18.2 % (4.5 %) for *stx*. *E. coli* strains exhibiting an ζ -Hly phenotype were detected in 66.5 % of the calves and 21.9 % of fecal samples. The *est* gene was detectable in 31.7 % of the calves from only 9 of 11 herds and in 7.8 % of the samples. Calves shedding DAEC or typical EPEC were not identified. The detection frequency of virulence traits significantly depended on the calves' age and shedding dynamics differed between the traits. A significant correlation between calf diarrhea and shedding of EHEC virulence traits was determined for several postnatal periods (1st week: Hly_{EHEC}; 1st & 10th week: *eae*; 4th week: *stx*). Shedding of ETEC (*est*) was associated with diarrhea in newborn calves (1st week) only. Hly_{EHEC}- and ζ -Hly-producing *E. coli* were shed significantly more frequently by diarrheic calves in 1st and 8th week of life, respectively. This knowledge will be instrumental for designing studies on the pathogenic potential for bovines and humans of diarrheagenic *E. coli* that are shed by young calves with differing dynamics.

XVIII. Prävalenz von enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) in Lebensmitteln

M. Garcia Diez¹, J. Westermann¹, S. Wolf¹, K. Meindl¹, B. Schalch², A. Sing¹, U. Busch¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim

² Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Oberschleißheim

Seit EPEC 1940 erstmals in einem Durchfallausbruch bei Kindern in Großbritannien nachgewiesen wurde, stellen diese Erreger in Deutschland unter den intestinalen *E.coli*-Pathovaren (außer EHEC) den größten Anteil der Isolierungen dar.

EPEC-Stämme sind charakterisiert durch die Bildung von charakteristischen „*attaching and effacing*“ (a/e)-Läsionen in der Darmschleimhaut und keine Shigatoxin 1 bzw. 2 Produktion.

Obwohl die Ausbrüche in Industrieländern deutlich zurückgegangen sind, spielt dieser Keim in Entwicklungsländern noch eine große Rolle.

EPEC Erkrankungen betreffen vor allem Kinder unter zwei Jahren, jedoch können immunsupprimierende Erwachsene auch klinische Symptome zeigen. Sie sind als Erreger der klassischen Säuglingsdiarrhö bzw. Säuglingsdyspepsie bekannt.

Die Infektionen zeichnen sich durch akute, zum Teil wässrige Durchfälle aus, die von Erbrechen begleitet sein können.

Neben seiner Rolle als gesundheitlich bedenklicher Erreger, gilt *Escherichia coli* in der Lebensmittelhygiene als Indikatorkeim, da die Anwesenheit auf eine fäkale Kontamination bzw. unhygienische Prozessführung hinweist. Aus diesem Grund sind in der Regel kontaminierte Lebensmittel die wichtigste Infektionsquelle von EPEC.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung wurde Vorkommen und Verbreitung der enteropathogenen *Escherichia coli* in verschiedenen Lebensmitteln (Wurstwaren, Rohfleisch, Salat, Säfte etc.) erfasst.

Nach Anzucht des Probenmaterials auf Endoagar (37°C, 18 h) und Abschwemmung der Bakterienkolonien erfolgte der Nachweis der spezifischen Gene mittels Real-Time-PCR. Für EPEC wird das *eae*-Gen mittels spezifischer Primersysteme detektiert.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Untersuchung 132 Lebensmittel-, 41 Trinkwasser-, 44 Oberflächenwasser- und 20 Milchproben auf EPEC geprüft. Dabei konnten 25 EPEC (9,3 %) positive Proben ermittelt werden.

XIX. Occurrence of “pathoadaptive mutations” in the *cadBA* operon in several intestinal *E. coli*.

J. Jores, A. G. Torres, S. Wagner, Ch. B. Tutt, J. B. Kaper, and L. H. Wieler

¹Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Philippstr. 13, 10115 Berlin, Germany, wieler.lothar@vetmed.fu-berlin.de

²Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas 77555-1070, USA

³Center for Vaccine Development, School of Medicine, University of Maryland, 685 W. Baltimore St., Baltimore, MD 21201, USA

Keywords: *cadBA*, lysine decarboxylase, *E. coli*, pathoadaptive mutation

The dysenteric *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) have evolved from commensal *E. coli* by the acquisition of a virulence plasmid and inactivation of genes of the *cad* locus encoding lysine decarboxylase (LDC) by so-called pathoadaptive mutation. As horizontal gene transfer and recombination occurs frequently in *E. coli* we were interested to see if similar pathoadaptive mutations are commonly present in other intestinal pathotypes. Therefore, we examined 140 intestinal *E. coli* strains of various pathotypes and the ECOR collection for their ability to decarboxylate lysine, and identified 25 strains that were unable to do so. Complementation of a Shiga toxin-producing *E. coli* and two enteropathogenic *E. coli* strains, both LDC-negative, with the intact *cad* locus restored the LDC-activity and resulted in a reduction in adherence to tissue culture cells. We investigated the *cad* locus for possible alterations by using hybridization and PCR techniques and compared the results with the alterations reported for *Shigella* spp. and EIEC strains. Interestingly, the alterations of the *cad* genes were similar to those previously reported, pointing towards a parallel evolution of LDC silencing in different intestinal *E. coli* pathotypes

XX. Virulenzfaktoren enteroaggregativer *E. coli* (EAEC) aus humanen Isolaten

Rita Prager, Angelika Fruth, Helmut Tschäpe

Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, 38855 Wernigerode, Burgstraße 37

Schlüsselwörter: Enteroaggregative *E. coli*, Serotypen, Virulenzplasmide, Virulenzgene

Keywords: enteroaggregative *E. coli*, serotypes, virulence plasmids, virulence genes

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) sind weltweit ansteigende, enterische Keime. Sie verursachen akute und persistierende Diarrhöen bei Kindern, Erwachsenen sowie HIV-infizierten Personen in Entwicklungsländern, sind aber auch in Industrieländern durch Ausbrüche und Fälle sogenannter "traveler's diarrhea" beschrieben worden.

Die Fähigkeit, lange im Darm zu persistieren, macht diese Erreger zu potenziellen Rezipienten von stx-Phagen.

Neben einer Vielfalt von "typischen" EAEC sind solche EHEC/STEC mit enteroaggregativen Virulenzeigenschaften bereits publiziert worden.

Die Heterogenität dieses Pathogens erfordert eine verbesserte Diagnostik. Der Nachweis der Virulenzplasmid-kodierten Gene *aat* und *aggR* differenziert typische von untypischen EAEC.

Unser Ziel war es, diese sogenannten typischen EAEC hinsichtlich ihrer Virulenzplasmid-kodierten Gene und chromosomal-kodierten Virulenzgene zu charakterisieren.

36 EAEC-Isolate aus den Einsendungen des NRZ wurden als "typische" EAEC isoliert, von denen 5 "importierte" Fälle sind.

EAEC gehören einer breiten Palette unterschiedlicher Serovare an, wobei einzelne, wie z. B. O3:H2 und O86:H27 in unserem Material gehäuft auftraten.

Es wurden 3 Virulenzplasmidtypen pAA1, pAA2 und pAA3, die sich hinsichtlich ihrer Fimbrien unterscheiden, nachgewiesen und mittels Adhärenzbestimmung auf HEp-2-Zellen weiter charakterisiert.

Durch die Testung eines breiten Spektrums von Virulenzgenen durch PCR, die größtenteils auf verschiedenen PAIs liegen, konnten unter unseren Isolaten sowohl Stämme, die zum intestinalen Pathotyp (EAEC-I) als auch zum extraintestinalen Pathotyp (EAEC-II) gehören, nachgewiesen werden.

Literatur:

- [1] Jenkins C, Chart H, Willshaw GA, Cheasty T, Smith HR. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 55:13-9.
- [2] Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2006; 55:1303-11.

XXI. Untersuchung von humanen Stuhlproben und Lebensmittelproben auf verschiedene Pathovare (EHEC, ETEC, EIEC) von *Escherichia coli* in Bayern

J. Westermann¹, M. García Díez¹, S. Wolf¹, K. Meindl¹, B. Schalch², A. Sing¹, U. Busch¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim

² Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Oberschleißheim

Die enteropathogenen *Escherichia coli* werden aufgrund der sich unterschiedlich darstellenden Krankheitsbilder und der charakteristischen Virulenzfaktoren in verschiedene Pathovare unterteilt: enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC); enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und enteroaggregative *E. coli* (EAEC/EAggEC).

EHEC, auch als shigatoxinbildende (STEC) oder verotoxotoxische *E. coli* (VTEC) bezeichnet, rufen beim Menschen verschiedenartige intestinale Erkrankungen bis hin zu lebensbedrohlichen postinfektiösen Syndromen hervor, wie etwa das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) oder die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP).

ETEC wird durch die Eigenschaft der Enterotoxin-Bildung charakterisiert. Die Toxine werden in hitzelabile (LT) und hitzestabile (ST) geteilt. Das klinische Bild der durch enterotoxische *E. coli* ausgelösten Krankheitsfälle ist durch choleraähnliche Durchfälle charakterisiert. Sie sind als ein auslösendes Agens bei Reisediarrhöen von wissenschaftlichem Interesse.

Erkrankungen durch EIEC sind von ruhrähnlichem Durchfall gekennzeichnet. Bezüglich ihrer pathogenen Eigenschaften sind sie den Shigellen sehr ähnlich. Kontaminierte Lebensmittel sind in der Regel die Infektionsquelle.

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung wurde Vorkommen und Verbreitung unterschiedlicher *E. coli*-Pathovare in verschiedenen Lebensmitteln (Wurstwaren, Rohfleisch, Salat, Säfte etc.) sowie in humanen Stuhlproben erfasst, die das LGL von bayerischen Gesundheitsämtern während des Jahres 2005 zugesandt bekommen hat.

Nach Anzucht des Probenmaterials auf Endoagar (37°C, 18 h) und Abschwemmung der Bakterienkolonien folgte der Nachweis der verschiedenen spezifischen Gene mittels Real-Time-PCR. Für EHEC wurden die Shigatoxingene *stx1* und *stx2*, für ETEC die Gene der hitzelabilen (LT) und hitzestabilen (ST) Toxine und für EIEC das *ipa H*-Gen mittels spezifischer Primersysteme detektiert.

Im Jahr 2005 wurden 3505 Stuhlproben auf EHEC untersucht. Dabei konnten 183 EHEC positive Stuhlproben (5, 2 %) ermittelt werden.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Untersuchung 132 Lebensmittel- und 85 Wasserproben auf ETEC und EIEC geprüft. 7 ETEC (8,2 %) und keine EIEC positive Probe wurden gefunden.

XXII. Phänotypische und genotypische Charakterisierung von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O26

Martina Bielaszewska, Wenlan Zhang, Alexander Mellmann, Robin Köck, Helge Karch

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster,
mbiela@uni-muenster.de

Schlüsselwörter: Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) – hämolytisch-urämisches Syndrom – Diarrhö – Virulenzgene

Keywords: enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) – hemolytic uremic syndrome – diarrhea – virulence genes

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) O26:H11 verursachen Durchfallerkrankungen und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens im Kindesalter. EHEC O26 produzieren Shiga Toxin (Stx) 1, Stx2 oder beide Zytotoxine. Seit 1996 wurden von HUS-Patienten in Deutschland zunehmend EHEC O26-Stämme isoliert, die Stx2 produzieren und eine erhöhte Virulenz aufweisen. Neben den bekannten Stx wurden weitere potenzielle Virulenzfaktoren in EHEC O26 identifiziert. Hierbei handelt es sich um Determinanten, die man zu den Familien der Zytolysine (EHEC-Hämolysin), Serinproteasen (EspP), Lymphotoxine (Efa-1) und Adhäsine (Intimin) rechnet. Die kodierenden Gene liegen auf Pathogenitätsinseln (*eae*, *efa-1*) oder sind in Phagen (*stx*) und Plasmiden (EHEC-*hlyA*, *espP*) inseriert. Darüber hinaus beherbergen EHEC O26 im Gegensatz zu anderen EHEC-Serovaren die „High-Pathogenicity Island“ (HPI), die zuerst in enteropathogenen Yersinien beschrieben wurde. Diese kodiert für die Biosynthese, Regulation und den Transport des Siderophors Yersiniabaktin. Vergleichende Genomanalysen von apathogenen *E. coli* mit EHEC O26 sowie Untersuchungen der Mechanismen und Faktoren, die am Transfer von Virulenzgenen beteiligt sind, erlauben Rückschlüsse auf die Evolution von EHEC O26. Sie liefern die Erklärung, wie durch horizontalen Gentransfer Virulenzgene von z. T. weit entfernt verwandten Bakterien übernommen werden und zeigen beispielhaft, wie binnen kürzester Zeit neue und besonders virulente Varianten innerhalb eines *E. coli* Serovars entstehen können. Die alleinigen klassischen Methoden der Bakteriologie erweisen sich immer mehr als unzureichend, um das Gefährdungspotenzial dieser Erreger zu bestimmen. Diese Erkenntnisse erfordern die Erfassung des Pathogenitätsprofils, um die fortschreitende Entwicklung von neuen Pathogenen rechtzeitig zu entdecken.

XXIII. Proteinchemische und molekularbiologische Charakterisierung der Serinprotease EspP

Jens Brockmeyer, Marie Luise Bonn, Martina Bielaszewska, Helge Karch

Universität Münster, Institut für Hygiene und Konsiliarlaboratorium für Hämolytisch-Urämisches Syndrom, Münster

Die Infektion mit Shiga Toxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC) kann zur Ausbildung einer hämorrhagischen Kolitis oder dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) führen, der häufigsten Ursache für akutes Nierenversagen bei Kindern. In der Frühphase der Erkrankung weisen Laborparameter auf eine prothrombotische Aktivierung von Koagulationsfaktoren, Thrombozyten und Endothel hin. Wir haben in Vorarbeiten gezeigt, dass die Serinprotease EspP in der Lage ist, den Koagulationsfaktor V im Plasma zu spalten und somit Einfluss auf die Hämostase haben könnte. Dieser Effekt kann möglicherweise zur Pathogenese einer hämorrhagischen Kolitis und eines HUS beitragen. Ziel dieser Studie war die Untersuchung, ob strukturelle Polymorphismen in *espP*- Genen auftreten und inwieweit dies zu funktionalen Abweichungen wie veränderter Effizienz der Sekretion oder Verlust der proteolytischen Aktivität der kodierten Proteine führt. Die *espP*-Gene von STEC-Stämmen aus 55 Serogruppen wurden mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion mit *SspI*, *RsaI* und *AluI* auf das Vorkommen von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) untersucht. Ein repräsentativer Teil der *espP*-Gene wurde zur detaillierten Analyse der genetischen Unterschiede sequenziert.

Zur Untersuchung der Sekretionseffizienz des Autotransporterproteins EspP wurden die Proteine aus dem Kulturüberstand aufgereinigt und mittels Western-Blot-Analyse mit anti-*espP*-Antikörper analysiert. Die proteolytische Aktivität der gereinigten Proteinproben wurde gegen Pepsin A und chromogene pNA-konjugierte Oligopeptide getestet.

Die *espP*-Gene in den untersuchten Stämmen zeigten deutliche Heterogenität. Demgegenüber waren die funktionalen Eigenschaften der kodierten Proteine in der Mehrheit der untersuchten Stämme erhalten, wobei für einen Teil der untersuchten Proben ein Verlust der proteolytischen Aktivität oder der Transportfunktion gezeigt werden konnte. Unsere Daten liefern neue Einblicke in die Rolle von EspP als vermeintlichem, Serotyp-unabhängigem Virulenzfaktor von STEC.

XXIV. Dünnschichtchromatografische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen

Josefine Betz¹, Christian H. Schweppe², Andreas Bauwens², Martina Bielaszewska², Helge Karch² und Johannes Müthing¹

¹Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 31, D-48149 Münster; jm@uni-muenster.de

²Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster

Schlüsselwörter: Stx1-Rezeptoren, Endothelzellen, Gb3Cer/CD77, HPTLC

Glykosphingolipide (GSL) der Globo-Serie stellen die Rezeptoren von Shiga Toxin (Stx) 1 dar. Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77) repräsentiert den „high-affinity“ und Globotetraosylceramid (Gb4Cer) den „low-affinity receptor“ von Stx1. Die Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie (high-performance thin-layer chromatography, HPTLC) wird als universelle Trennmethode zur initialen Charakterisierung von GSL-Gemischen eingesetzt. Neuerungen sind dem ELISA ähnliche Verfahren (Overlay-Assay), mit denen unter Zuhilfenahme von GSL-spezifischen Antikörpern oder Toxinen GSL nach dünnschichtchromatografischer Trennung direkt auf der HPTLC-Platte nachgewiesen werden.

Endothelzellen (endothelial cells, ECs) verschiedener vaskulärer Herkunft zeigen eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber Stx1. Es ist zu vermuten, dass derartige Unterschiede auf der unterschiedlichen Expression des dominanten Stx1-Rezeptors Gb3Cer beruhen. Bei den hier untersuchten Zelllinien handelt es sich um mikrovaskuläre ECs aus menschlichem Gehirn (human brain microvascular endothelial cells, HBMECs) und um makrovaskuläre EA.hy 926-Zellen, die durch Fusion einer humanen Epithelzelllinie (A549) mit Nabelschnurendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) gewonnen wurden. HBMECs zeigen eine geringe und EA.hy 926-Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber Stx1.

Um die Ursache für diesen Unterschied aufzuklären, wurden die beiden Zelllinien hinsichtlich ihres Gehaltes an Globo-Serie GSL untersucht. Dafür wurden größere Zellmengen mithilfe der Microcarrier-Technik in Spinnerflaschen produziert und aus den Zellen die GSL isoliert. Für ihre strukturelle Charakterisierung wurde eine Kombination aus HPTLC plus Overlay-Assay eingesetzt, bei dem Anti-Gb3Cer und Anti-Gb4Cer spezifische Antikörper sowie Stx1 plus Anti-Stx1-Antikörper verwendet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass HBMECs ein ausgewogenes Verhältnis an Gb3Cer und Gb4Cer aufweisen, wohingegen EA.hy 926-Zellen eine erhöhte Expression von Gb3Cer zeigen und kein Gb4Cer besitzen. Dieser Befund liefert die Erklärung für die unterschiedliche Sensitivität der beiden EC-Typen gegenüber Stx1. Die per HPTLC gewonnenen Daten lassen weiterhin den Schluss zu, dass EA.hy 926-Zellen bei dem Fusionsprozess ihrer Entstehung offenbar die für die Biosynthese von Gb4Cer erforderliche α 1,3-GalNAc-Transferase (Gb4Cer-Synthetase) „verloren“ haben. Dieser Stopp in der Biosynthese der Globo-Serie GSL auf der Stufe von Gb3Cer scheint ursächlich für die Akkumulation von Gb3Cer in EA.hy 926-Zellen verantwortlich zu sein. Damit konnte gezeigt werden, dass EA.hy 926-Zellen nicht mehr die typische GSL-Zusammensetzung ihrer Abstammungszellen (HUVECs) besitzen. Die weltweit in zahlreichen Zellkulturmodellen eingesetzten EA.hy 926-Zellen können daher nicht als „immortalisierte HUVECs“ angesehen werden, da sie sich von diesen in charakteristischer Weise unterscheiden.

XXV. Etablierung eines Bakterien-Adhäsionstests zur strukturellen Charakterisierung von *E. coli*-bindenden Glykosphingolipiden mittels Massenspektrometrie

Anne Müsken¹, Wenlan Zhang¹, Jamal Souady², Klaus Dreisewerd², Stefan Berkenkamp³, Martina Bielaszewska¹, Alexander W. Friedrich¹, Jasna Peter-Katalinić², Helge Karch¹ und Johannes Müthing²

¹Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 41, D-48149 Münster

²Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Str. 31, D-48149 Münster; jm@uni-muenster.de

³Sequenom GmbH, Mendelssohnstr. 15d, D-22761 Hamburg

Schlüsselwörter: Glykosphingolipide, Bakterienadhäsion, Gb3Cer/CD77, IR-MALDI-o-TOF-MS

Ähnlich wie die Shiga Toxine (Stx) binden einige uropathogene *E. coli*-Stämme (UPEC) bevorzugt an Glykosphingolipide (GSL) der Globo-Serie, wobei sie jedoch keine Präferenz für Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77) oder Globotetraosylceramid (Gb4Cer) zeigen, sondern beide GSL gleichermaßen „erkennen“. Nach Trennung von GSL-Gemischen mittels Hochleistungs-Dünnschichtchromatografie (high-performance thin-layer chromatography, HPTLC) auf mit Kieselgel vorbeschichteten Glasplatten kann mithilfe des Overlay-Verfahrens die Bindungsspezifität von Bakterien ermittelt werden. Dazu wird die HPTLC-Platte mit den zu untersuchenden Bakterien überschichtet und deren spezifische Bindung mit einem ELISA-ähnlichen Verfahren nachgewiesen. Im Falle von UPEC werden zur eindeutigen Rezeptor-Charakterisierung vergleichende Overlay-Assays mit Gb3Cer- und Gb4Cer-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Referenz diente eine GSL-Mischung aus humanen Erythrozyten, die Gb3Cer und Gb4Cer enthält.

Dieser Bakterien-Adhäsionstest konnte mit dem uropathogenen *E. coli*-Stamm HB101/pPIL291-15 etabliert werden, wobei der Nachweis an gebundenem UPEC mit einem polyklonalen Anti-*E. coli*-Antikörper und dem zugehörigen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper geführt wurde, der die BCIP-Farbreaktion vermittelt. Die strukturelle Charakterisierung der gebundenen Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies erfolgte mithilfe eines massenspektrometrischen Verfahrens, das als Infrarot-Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-orthogonal-Flugzeit-Massenspektrometrie (infrared matrix assisted laser desorption/ionisation orthogonal time-of-flight mass spectrometry, IR-MALDI-o-TOF-MS) bezeichnet wird. Das Besondere an diesem MS-Verfahren ist, dass die zu charakterisierenden Rezeptor-GSL durch Beschuss mit einem IR-Laser direkt vom Kieselgel der HPTLC-Platte desorbiert und ionisiert werden. Als Matrix für die IR-MALDI-MS dient Glycerol. Vor Einbringung des betreffenden Bereichs der HPTLC-Platte in das Massenspektrometer werden die an dem HPTLC-Streifen haftenden pathogenen Bakterien mittels Lysozym und durch intensive UV-Bestrahlung zerstört bzw. abgetötet, was durch einen „Agarplatten-Abklatsch-Test“ überprüft wird.

Das vorgestellte Verfahren ermöglicht eine strukturelle Charakterisierung von Bakterien-bindenden GSL direkt auf der HPTLC-Platte im Nanogramm-Bereich, bei dem auf die bisher notwendige Extraktion und Isolierung der GSL aus dem Kieselgel verzichtet werden kann. Mit diesem Kombinationsverfahren sollte es möglich sein, GSL-Rezeptoren von enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen zu identifizieren.

XXVI. Transcriptional regulation of the adherence/lymphocyte inhibitory factor *efa1/lifA* gene of an enterohemorrhagic *E. coli* strain

U. Böhnke, J. Jores, *Karsten Tedin* and L. H. Wieler

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Philippstrasse 13, D-10115 Berlin, Germany, tedin.karsten@vetmed.fu-berlin.de

Keywords: EHEC, Efa/LifA, Virulence, Regulation

EHEC are the most common cause of hemorrhagic colitis, haemolytic-uremic syndrome (HUS), a leading cause of acute renal failure in children [1]. Ruminants, especially cattle, are the main transient reservoir of EHEC, which are transmitted to humans primarily *via* contaminated food and water [2, 3, 4]. In addition to the locus of enterocyte effacement (LEE), Shiga-toxin and haemolysin, these pathotypes harbor many other potential virulence genes. One of these virulence-associated genes, EHEC factor for adherence/lymphocyte inhibitory factor (*efa1/lifA*), was described as part of the LEE pathogenicity islands of the bovine O103:H2 strain RW1374 (PAI I_{RW1374}); [5]. *efa1/lifA* is the largest virulence-associated *E. coli* gene, but its function and regulation is currently not known.

In this study we identified the transcriptional start site of the *efa1/lifA* gene and determined the promoter activities of an *efa1/lifA* promoter-*lacZ* fusion in *E. coli* K-12. While the strongest promoter activity was observed in complex medium, the promoter was most active during the early logarithmic phase in all media tested. This regulation parallels the expression patterns of two global regulatory proteins, Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) and Factor for inversion stimulation (Fis), suggesting either regulation by these factors or a similar growth phase control. We therefore examined the effects on *efa1/lifA* expression in *lrp* and *fis* mutant strain backgrounds as well as the influence of different growth media. The results suggest that Lrp plays a role in the regulation of *efa1/lifA* expression, possibly in a complex with Fis.

Literature:

- [1] Karch, H. et al. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* 295:405-18.
- [2] Karch, H., et al. (1999) A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67:5994-6001.
- [3] Wieler, L. H. et al. (1998) Virulence Properties of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) Strains of Serogroup O118, a major Group of STEC Pathogens in Calves. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1604-1607
- [4] Wieler, L. H. et al. (2007) Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* (im Druck).
- [5] Jores, J. et al. (2005) Description of a 111 kB pathogenicity island (PAI) containing various virulence features in the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2/NM. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 417-425

XXVII. In vitro effect of release/production of Shiga toxin (Stx) by different serogroups of VTEC following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents

Katharina Grif, Dorothea Orth, Abdul-Basit Khan, Asma Naim, Manfred P. Dierich, Reinhard Würzner

Austrian Reference Laboratory for EHEC at the Department of Hygiene, Microbiology and Social Medicine, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

Infection with the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), which can cause haemolytic uraemic syndrome, is a significant health concern all over the world. There is no consensus regarding the benefit versus harm of antibiotic therapy for treatment of disease due to EHEC. Increased recognition of EHEC as a human pathogen by the medical community has raised the question whether patients may benefit from antibiotic therapy. Studies in hospitalized patients indicate that antimicrobial agents, when administered in the early stages of *Escherichia coli* O157-associated enterocolitis, are more likely to have detrimental effects (increased incidence of HUS and fatal outcomes). However, in some studies antibiotic therapy was observed to have had no negative effects on the progression of *Escherichia coli* O157-associated enterocolitis to HUS.

The aim of our study was to investigate the in vitro effect of different concentrations of five antimicrobial agents on the Shiga toxin (Stx) amount released by different EHEC strains expressing Stx1 or Stx2 either alone or in combination.

Ten different EHEC isolated from patients at the Austrian Reference Laboratory for EHEC were investigated in this study. The five antimicrobial agents tested belong to three different antibiotic groups (β -lactam antibiotics, glycopeptides and aminoglycosides), that are most frequently used in therapy in the paediatric wards. The cytotoxicity was determined by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release into the supernatant of damaged Vero cells.

We found that different EHEC strains varied in the toxin amount released in the absence of antimicrobial agents. Under influence of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents no serogroup- or antibiotic-specific patterns were observed, yet. In addition, the application of inhibitory and subinhibitory concentrations has different influences on the Stx amount in the culture supernatants.

We continue to search for an antibiotic agent which reduces or at least does not increase Stx release for most isolates in vitro and may thus form a candidate, beneficial for the treatment of EHEC infections in vivo.

XXVIII. Langzeitausscheider von EHEC – Probleme und Konsequenzen

Fritz Oberparleiter¹, Ulrich Busch², Andreas Sing²

¹Landratsamt Roth, Gesundheitsamt

²Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

Gem. § 42 Infektionsschutzgesetz (IfSG) dürfen Personen, die an EHEC-Infektionen erkrankt oder dessen verdächtig sind, beim gewerbsmäßigen Herstellen, Behandeln oder Inverkehrbringen der in Abs. 2 aufgelisteten Lebensmittel nicht tätig sein oder beschäftigt werden, wenn sie dabei mit diesen in Berührung kommen. Dies gilt sinngemäß auch für Beschäftigte in Küchen von Gaststätten, Kantinen, Krankenhäusern, Säuglings- und Kinderheimen (sowie in weiteren Bereichen der Gemeinschaftsverpflegung).

Im Juli 2002 wurde nach einer Anzeige der Lebensmittelüberwachung über Isolierung von VTEC in einer Hackfleischprobe in einem Supermarkt bei den Mitarbeitern der Wurst- und Fleischabteilung des Marktes Stuhlproben entnommen. Bei 3 Mitarbeitern wurden EHEC nachgewiesen, u. a. auch beim herstellenden Metzgermeister und dessen Ehefrau, die in der Abteilung als Verkäuferin arbeitet. Bei den 3 Ausscheidern wurde ein Tätigkeitsverbot angeordnet, das bei einem Mitarbeiter bereits im Oktober 2002 aufgehoben wurde. Bei der Ehefrau konnte erst im Februar 2004 nach 3 negativen Stuhlproben das Tätigkeitsverbot entfallen. Beim Metzgermeister ergab sich durchgehend bei den Stuhlproben, zuletzt im April 2005, der molekular-biologische Nachweis von Shiga-like Toxin 1. Der Betroffene hat aufgrund seiner beruflichen Einschränkungen erhebliche Bemühungen, auch unkonventioneller Art, unternommen, um erregerefrei zu werden. Aktuell wurde nach Rücksprache mit dem nach dem Wohnort zuständigen Gesundheitsamt nochmals eine Beprobung der gesamten Familie, einschließlich der 3 Töchter mit Anhang und der Hauskatze, durchgeführt. Ein direkter Kontakt zu landwirtschaftlichen Betrieben ist ausgeschlossen. Aufgrund seiner beruflichen Ausbildung hält sich der Betroffene eng an hygienische Vorschriften. Er konnte im Betrieb verbleiben, hat aber keinen direkten Kontakt mehr mit Lebensmitteln.

Laboranalytisch konnte von 12/2002 bis 08/2003 mehrmals ein EHEC-Stamm mit dem Serotyp O 128 H2 isoliert werden, der einen positiven Nachweis für die Pathogenitätsfaktoren stx-1 und stx-2 aufwies. Seit 21.10.2003 wurde der Stuhl des Ausscheiders insgesamt 15-mal analysiert, dabei konnte in 14 Fällen ein positives Ergebnis für stx-1 nachgewiesen werden. Die Aufhebung des Tätigkeitsverbots wurde mit Schreiben vom 16.09.2005 mitgeteilt.

XXIX. Charakterisierung NleA-kodierender Bakteriophagen von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)

Sabine Stingel, Kristina Creuzburg und Herbert Schmidt

Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Universität Hohenheim, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) können Epithelzellen schädigen, indem sie Typ III Effektorproteine in das Cytoplasma der Wirtszelle translozieren. Dies geschieht mithilfe eines Typ III Sekretionssystems (T3SS), welches einen makromolekularen Komplex ausbildet, der die Cytoplasmamembran und die äußere Membran der Bakterien durchspannt und mit einer nadelförmigen Struktur den Kontakt zur Plasmamembran der Wirtszelle herstellt. Über diese nadelförmige Struktur werden Effektorproteine direkt in die Zelle injiziert. Das T3SS und einige Effektorproteine sind innerhalb des sogenannten „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE), einer Pathogenitätsinsel des Bakterienchromosoms kodiert. Es wurde gezeigt, dass weitere Typ III Effektorproteine außerhalb des LEE im Genom kryptischer oder intakter Prophagen kodiert sind. Zu diesen Effektorproteinen gehört unter anderen NleA („Non-LEE encoded Effector A“), dessen Funktion bisher unbekannt ist. In einer Studie konnte *nleA* bei 149 von 170 untersuchten EHEC und enteropathogenen *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden. Es wird eine Assoziation zwischen *nleA* und schweren Krankheitsbildern vermutet. Bis heute sind 14 verschiedene *nleA*-Varianten bekannt, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zwischen 71% bis 96% aufweisen.

Mithilfe von Plaque-Hybridisierungen konnten bisher einige der 14 *nleA*-Varianten im Genom induzierbarer Bakteriophagen nachgewiesen werden. Zum Teil tragen diese EHEC Stämme zusätzlich Stx-konvertierende Phagen. Während der bereits näher charakterisierte Prophage BP-4795 des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 neben *nleA* ein Shiga Toxin (*stx*)-Gen trägt, werden in den bisher untersuchten Stämmen *stx* und *nleA* von verschiedenen Phagen kodiert. Generell sind *nleA*-Varianten stromabwärts der Morphogeneseregion innerhalb des Phagen-Genoms lokalisiert und ihre flankierenden Bereiche weisen ein heterogenes Bild auf.

Die hier vorgestellten Arbeiten unterstützen die Annahme, dass Bakteriophagen wesentlich zur Ausstattung der EHEC mit Virulenzfaktoren beitragen.

Referentenverzeichnis

Prof. Dr. Dr. habil. Georg **Baljer**

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Gießen

Dr. Stefanie **Barth**

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Gießen

Prof. Dr. Rolf **Bauerfeind**

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Gießen

Josefine **Betz**

Institut für Medizinische Physik und Biophysik am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 31, 48149 Münster

PD Dr. Lothar **Beutin**

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Nationales Referenzlabor für Escherichia coli,
Zentrum für Infektiologie und Erregercharakterisierung
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Dr. Martina **Bielaszewska**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Ute **Böhnke**

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin,
Philippstr. 13, 10115 Berlin

Jens **Brockmeyer**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Dr. Ulrich **Busch**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Kristina **Creuzburg**

Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie,
Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie
Grabenstr. 28, 70599 Stuttgart

Dr. Johannes **Dressmann**

Niedersächsisches Landesgesundheitsamt
Roesebeckstr. 4-6, 30449 Hannover

Dr. Christina **Frank**

Abteilung für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut
Seestr. 10, 13353 Berlin

PD Dr. Alexander **Friedrich**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Dr. Angelika **Fruth**

Nationales Referenzlabor für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger,
Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode
Burgstr. 37, 38855 Wernigerode

Martha **Garcia-Diez**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Dr. Lutz **Geue**

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für Epidemiologie
Seestr. 55, 16868 Wusterhausen

Dr. Katharina **Grif**

Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität
Schöpfstr. 41, A-6020 Innsbruck

PD Dr. Herbert **Hächler**

Nationales Zentrum für enteropathogene Bakterien (NENT), Kantonsspital Luzern
CH-6000 Luzern 16

Annette **Heißenhuber**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Prof. Dr. Volker **Hingst**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Dr. Jörg **Jores**

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin
Philippstr. 13, 10115 Berlin

Prof. Dr. Helge **Karch**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Dr. Matthias **Kuhn**

CONGEN Biotechnologie GmbH
Robert Rössle Str. 10, 13125 Berlin

Dr. Anselm **Lehmacher**

Institut für Hygiene und Umwelt
Marckmannstr. 129a, 80539 Hamburg

Dr. Alexander **Mellmann**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

PD Dr. Christian **Menge**

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Gießen

Andrea **Menrath**

Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstr. 40, 24098 Kiel

Dr. Ute **Messelhäußer**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Melanie **Mohr**

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Gießen

Anne **Müsken**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Prof. Dr. Johannes **Müthing**

Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 31, 48149 Münster

Dr. Sabine **Nitzsche**

Institut für Lebensmittelsicherheit und Hygiene, Universität Zürich
Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zürich

Dr. Fritz **Oberparleiter**

Landratsamt Roth, Gesundheitsamt
Weinbergweg 10, 91154 Roth

Dr. Dorothea **Orth**

Österreichisches Referenzzentrum für EHEC, Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin der Medizinischen Universität
Schöpfstr. 41, A-6020 Innsbruck

Katja **Paul**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Dr. Rita **Prager**

Nationales Referenzlabor für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger ,
Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode
Burgstr. 37, 38855 Wernigerode

Dr. Udo **Reischl**

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg
F.-J.-Strauß Allee 11, 93053 Regensburg

Dr. Peter **Schierack**

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin
Philippstr. 13, 10115 Berlin

Prof. Dr. Herbert **Schmidt**

Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie,
Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie
Grabenstr. 28, 70599 Stuttgart

Dr. Stephan **Schranner**

Landratsamt Landshut, Veterinäramt
Veldener Str. 15, 84036 Landshut

Carolin **Schreiber**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

PD Dr. Sören **Schubert**

Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Marchioninistr. 17, 81377 München

Christian Hennig **Schweppe**

Institut für Medizinische Physik und Biophysik am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 31, 48149 Münster

PD Dr. Andreas **Sing**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Prof. Dr. Klaus **Stark**

Abteilung für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut
Seestr. 10, 13353 Berlin

Prof. Dr. Roger **Stephan**

Institut für Lebensmittelsicherheit und Hygiene, Universität Zürich
Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zürich

Sabine **Stingel**

Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie,
Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie
Grabenstr. 28, 70599 Stuttgart

Dr. Dirk **Werber**

Abteilung für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut
Seestr. 10, 13353 Berlin

Prof. Dr. Lothar H. **Wieler**

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin
Philippstr. 13, 10115 Berlin

PD Dr. Manfred **Wildner**

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Prof. Dr. Dr. Reinhard **Würzner**

Österreichisches Referenzzentrum für EHEC, Department für Hygiene, Mikrobiologie und
Sozialmedizin, Sektion Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Fritz-Pregl-Str. 3, A-6020 Innsbruck

Prof. Dr. Lothar Bernhard **Zimmerhackl**

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde
Aurichstr. 35, A-6020 Innsbruck

Dr. Wenlan **Zhang**

Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Dr. Claudio **Zweifel**

Institut für Lebensmittelsicherheit und Hygiene, Universität Zürich
Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zürich



91058 **Erlangen**
Eggenreuther Weg 43
Telefon: 09131/764-0



85764 **Oberschleißheim**
Veterinärstraße 2
Telefon: 089/31560-0



97082 **Würzburg**
Luitpoldstraße 1
Telefon: 0931/41993-0



80538 **München**
Pfarrstraße 3
Telefon: 089/2184-0

www.lgl.bayern.de

**Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit**
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131/764-0
Telefax: 09131/764-102

Internet: www.lgl.bayern.de
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

Druck: Print Com, Erlangen

ISBN 978-3-939652-25-0
ISBN 978-3-939652-26-7

(Print Version)
(Online Version)