

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

**Molekulares Profil und phänotypische Analyse von
enterohämorrhagischen und enteropathogenen *Escherichia
coli* der Serogruppe O26**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms - Universität Münster

vorgelegt von

Geueke, Andrea Maria

Lennestadt

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms - Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt
Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen
Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen

Zusammenfassung

von
Andrea Geueke

Molekulares Profil und phänotypische Analyse von enterohämorrhagischen und enteropathogenen *Escherichia coli* der Serogruppe O26

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) und atypische enteropathogene *Escherichia coli* (aEPEC) gelten weltweit als Auslöser von Durchfallerkrankungen. EHEC können darüber hinaus das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen. Ein Unterscheidungskriterium zwischen EHEC und aEPEC ist die Fähigkeit zur Shiga Toxin-Produktion. Im Gegensatz zu typischen EPEC fehlt den aEPEC das EAF-Plasmid. Im Rahmen dieser Arbeit wurden EHEC und aEPEC der Serogruppe O26 molekularbiologisch und phänotypisch charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass beide Pathogruppen EHEC-Hämolysin produzieren und gegenüber Tellurit resistent sind. Die *E. coli* O26 Stämme waren nicht in der Lage Rhamnose zu fermentieren. Sowohl aEPEC als auch EHEC beherbergten das für Intimin kodierende *eae-β*-Gen und trugen, unabhängig von ihrer Beweglichkeit, das für Flagellin kodierende *fliCH11*- Gen. Zudem zeigt sich, dass neben den bekannten Shiga Toxinen weitere potentielle Virulenzfaktoren in EHEC und aEPEC O26 vorkommen. Hierbei handelt es sich um Determinanten, die man zu den Familien der Zytolysine (EHEC-Hämolysin) und Adhäsine (Intimin) rechnet. Die alleinigen klassischen Methoden der Bakteriologie erweisen sich zunehmend als unzureichend, um das Gefährdungspotential dieser Erreger zu bestimmen. Diese Erkenntnisse erfordern die Erfassung zusätzlicher Virulenzmarker, um die Virulenz derartiger Stämme zu erkennen und die fortschreitende Entwicklung von neuen Pathogenen rechtzeitig zu entdecken.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2008

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | ZIELSETZUNG | 6 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 7 |
| 3.1 | Material..... | 7 |
| 3.1.1 | Herkunft der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme | 7 |
| 3.1.2 | Definition der Erkrankungen | 8 |
| 3.1.3 | Geräte | 8 |
| 3.1.4 | Reagenzien und Verbrauchsmaterialien | 9 |
| 3.2 | Methoden | 11 |
| 3.2.1 | Phänotypische Untersuchung | 11 |
| 3.2.2 | Polymerasekettenreaktion | 15 |
| 3.2.3 | Agarosegel-Elektrophorese | 19 |
| 3.2.4 | Restriktionsanalyse | 20 |
| 4 | ERGEBNISSE | 21 |
| 4.1 | Phänotypische Untersuchung | 21 |
| 4.1.1 | Darstellung der biochemischen Reaktionen im API 20 E | 21 |
| 4.1.2 | Resistenzverhalten im Agardiffusionstest | 25 |
| 4.1.3 | Untersuchung auf Hämolyse, Sorbitol- bzw. Rhamnosefermentation und Telluritresistenz | 27 |
| 4.2 | Molekularbiologische Untersuchungen | 28 |
| 4.2.1 | Sicherung der Serotypie | 28 |
| 4.2.2 | Gendistribution von Pathogenitäts- und Widerstandsfaktoren | 30 |
| 5 | DISKUSSION | 32 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 40 |
| 7 | ANHANG | 47 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | 47 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis | 49 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis | 50 |
| 8 | LEBENS LAUF | 51 |
| 9 | DANKSAGUNG | 52 |

1 Einleitung

Escherichia coli (*E. coli*) sind fakultativ anaerobe Bakterien, die als apathogene Keime die Darmflora des Menschen besiedeln. Zusätzlich zu diesen apathogenen Stämmen wurden in den letzten Jahrzehnten fünf weitere obligat pathogene *E. coli* Stämme identifiziert, die ein breites Krankheitsspektrum im menschlichen Körper verursachen können (48):

- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
- Enterotoxische *E. coli* (ETEC)
- Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

In dieser Studie wurden besondere Merkmale der enteropathogenen und enterohämorrhagischen *E. coli* (EPEC bzw. EHEC) untersucht um phylogenetische Rückschlüsse zu ermöglichen.

Das klinische Bild einer Infektion durch EHEC reicht von milden Durchfallerkrankungen über extraintestinale Infektionen, blutige Diarrhöen, thrombotisch-thrombozytopenische Purpura bis hin zum hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) (48). Eine EHEC-Infektion verläuft klinisch oft inapparent. In ca. einem Drittel der Erkrankungsfälle treten nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Tagen Abdominalkrämpfe mit wässrigen Durchfällen auf, die sich in 90% zu blutigen Durchfällen entwickeln (3, 38). Dazu können Übelkeit und Erbrechen entstehen. Fieber wird dagegen selten beobachtet. 10-20% der Erkrankten, besonders Säuglinge und Kleinkinder, entwickeln als schwere Verlaufsform eine hämorrhagische Colitis (52). Das HUS tritt bei ca. 15% der Patienten unter 10 Jahren auf (63): Es kommt zur hämolytischen Anämie, Thrombozytopenie, und schließlich zu einem akuten Nierenversagen (24). Unter Kleinkindern ist das HUS der häufigste Grund eines akuten Nierenversagens und verläuft in bis zu 20% der Fälle tödlich (11, 36).

Therapeutisch sind bei einem HUS frühzeitige stationäre Aufnahme und strikt symptomatische Behandlungen wie balancierte Volumensubstitution, Erythrozytenersatz, forcierte Diurese und bei globaler Niereninsuffizienz eine Hämodialyse angezeigt (18, 66, 73).

Im Jahr 2003 entwickelten von 1137 durch EHEC infizierte Patienten 7,2% ein hämolytisch-urämisches Syndrom. Im Jahr 2004 wurden 819 Patienten gemeldet, von denen insgesamt 92 (11,2%) am HUS erkrankten. Diese Zahlen verdeutlichen die Zunahme der gefährlichen Komplikationsverläufe unter EHEC-Infektionen (52).

EHEC besitzen als Leitmerkmal die Fähigkeit, Shiga Toxin (Stx) zu produzieren. Im Jahr 1983 konnte erstmalig eine Verbindung zwischen STEC (**S**higa **T**oxin-produzierende *E. coli*) und dem Auftreten von HUS bzw. anderen gastrointestinalen Erkrankungen hergestellt werden (39). Aufgrund dieser Krankheitsassoziation, ihrer Stx- und Hämolysinproduktion sind diese Bakterien seit 1987 als EHEC definiert (42). Neben der Stx-Produktion sind EHEC durch das Vorkommen einer Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren gekennzeichnet (s. u.). Wichtigster Serovar unter den EHEC ist *E. coli* O157:H7, der weltweit die meisten Krankheitsausbrüche verursacht (2, 64, 70). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Serovare identifiziert, die nicht dem Serovar O157:H7 angehören. Die häufigsten dieser Serovare sind O26:H11, O103:H2, O111:H8 und O145:H28 (12, 19), deren Verbreitung als Krankheitserreger weltweit zunimmt. Von diesen Serovaren ist *E. coli* O26:H11 am häufigsten verbreitet: Er gilt in Deutschland seit 1996 in $\frac{1}{7}$ aller Erkrankungen an HUS als Verursacher (21, 24), in den USA wird er bei 50% der Patienten mit blutiger Diarrhoe isoliert (34).

EPEC gelten als Hauptursache von Durchfallerkrankungen bei Kindern unter 1 Jahr (71). Innerhalb der EPEC Stämme erfolgt eine Unterteilung in typische und atypische EPEC (**a**EPEC) (s. Tabelle 1). Der beiden EPEC Gruppen gemeinsame Pathomechanismus beruht, ähnlich dem der EHEC auf deren Fähigkeit, A/E Läsionen („**a**ttaching and **e**ffacing lesion“) im intestinalen Epithel verursachen zu können. Typische EPEC besitzen das Virulenzplasmid EAF („**E**PEC **a**dherence **f**actor“), auf dem für die Genexpression des „locus of enterocyte effacement“ (LEE-Insel) wichtige Regulationsgene kodiert sind. Dies sind u.a. die Gene *perA*, *B*, *C* („**p**lasmid-**e**ncoded **r**egulator“) und *bfp*. Das Gen *bfp* kodiert für **b**undle-**f**orming-**p**ili (BFP) dessen Expression für die initiale

Anheftung der Bakterie an die Zielzelle verantwortlich ist. Des Weiteren wird das *bfp*-Gen als Nachweis für das Vorhandensein des EAF-Plasmids genutzt (46, 48). Typischen und atypischen EPEC gemeinsam sind die oben genannte Fähigkeit zum Setzen von A/E Läsionen und das Fehlen jeglicher Shiga bzw. Verotoxinproduktion. Typische EPEC besitzen das EAF-Plasmid mit *bfp*-Expression, wohingegen aEPEC dieses EAF-Plasmid nicht aufweisen und auch LEE unabhängige Virulenzfaktoren besitzen, wie z.B. das *EhlyA*-Gen (28, 53, 71).

Tabelle 1: Zuordnung verschiedener *E. coli* Serotypen zu typischen bzw. atypischen EPEC

(verändert nach Trabulsi *et al.*, 2002)

| Stamm EPEC | Serotyp |
|------------|--|
| typisch | u.a.: O55:H6, O86:H34, O111:H2, O142:H34/6 |
| atypisch | u.a.: O26:H11 , O55:H7/34, O86:H8, O111:H9/25 |

E. coli stellen normalerweise nicht-invasive Bakterien dar. Erst die Fähigkeit der enterohämorrhagischen *E. coli* zur Shiga Toxin-Produktion ermöglicht die mikroangiopathischen, thrombotischen Endothelläsionen, wie sie bei Erkrankungen durch EHEC typisch sind (45). Die Shiga Toxine werden in zwei Hauptgruppen, Shiga Toxin 1 (Stx₁) und Shiga Toxin 2 (Stx₂), mit je eigenen Nebenvarianten unterteilt (22, 41, 77). Nach Bindung des Toxins an einen membranständigen Glykosphingolipid-Rezeptor (Gp3), der sowohl in Niere, Darm als auch dem Gehirn exprimiert wird, erfolgt die Toxinaufnahme durch Endozytose. In der Zielzelle kommt es durch die Spaltung von Adenosinresten in der rRNA zur Inhibierung der Proteinsynthese und schlussendlich zur Apoptose (49, 50). Neben der Zellzerstörung sind Shiga Toxine in der Lage, die Expression von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen zu steigern (8, 47, 69) und dadurch in die Immunantwort und Hämatopoese einzugreifen (25, 54). Durch diese Mechanismen nehmen Shiga Toxine einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Krankheitssymptome, besonders des HUS, bei Infektionen durch EHEC. Die Auswirkungen des Stx₂ auf die Genregulation bzw. -expression der geschädigten Zellen sind erheblich

größer als die des Stx₁, wodurch die hohe Inzidenz der schweren Krankheitsverläufe durch Stx₂-produzierende EHEC begründet werden kann (45, 78). Ein weiterer Virulenzfaktor ist das attaching and effacing-Gen (*eae*-Gen), welches sowohl in EPEC als auch EHEC chromosomal auf der Pathogenitätsinsel „locus of enterocyte effacement“ lokalisiert ist und für das Membranprotein Intimin kodiert

(35). Neben der Shiga Toxin-Produktion gilt dieses Intimin in der Gruppe der EHEC als auch unter den EPEC als Hauptvirulenzfaktor (16). Intimin fungiert als Adhäsionsvermittler zwischen Bakterium und



Darmepithelzelle (46). Durch diese Adhäsion bildet das Protein die Grundlage der A/E Läsion,

Abbildung 1: Charakteristische EPEC-A/E-Läsion im Ileum. Während der Adhäsion scheint das Bakterium als typisches Merkmal wie auf einem Sockel an der Zellmembran zu sitzen (verändert nach Nataro und Kaper, 1998).

deren Pathomechanismus durch die folgenden Schritte charakterisiert ist: Zelladhäsion und Microvillizerstörung, mit anschließender Aggregation von polarisierten Zytoskelettstrukturen (59, 71), (siehe Abb. 1). Die A/E Läsion ist eine der Hauptursachen für das Entstehen der krankheitsdefinierenden Symptome einer *E. coli* Infektion. Insgesamt sind 14 *eae*-Genvarianten bekannt, die für unterschiedliche Intimintypen kodieren (9). In *E. coli* O26:H11 Isolaten wird hauptsächlich Intimin β 1 gefunden (76).

Atypische EPEC und EHEC O26:H11 enthalten ein ca. 104 kb großes Virulenzplasmid (48). Dieses Plasmid beherbergt das Gen *hlyA*, welches für ein porenbildendes Zytolysin, den Pathogenitätsfaktor EHEC-Hämolyysin kodiert (56). Die Rolle des EHEC-Hämolyisins bezüglich der Virulenz ist noch relativ unbekannt. Aus der Lyse der Erythrozyten resultiert eine erhöhte Konzentration an Häm und Hämoglobin, welche das Wachstum der *E. coli* verbessern. Außerdem beeinflussen diese Zytolysine sowohl Lympho- und Granulozyten als auch Tubulusepithelzellen der Niere (4, 13). Für α -Hämolyysin konnte bereits

eine erhöhte Interleukin β -Produktion im Zielorganismus nachgewiesen werden (62). EHEC-Hämolysin bewirkt einen ähnlichen Effekt. Interleukin β steigert durch eine vermehrte Gp3-Expression die Toxizität von Shiga Toxinen (40). Dies deutet auf eine synergetische Funktion von Shiga Toxinen und EHEC-Hämolysin in Bezug auf die Zerstörung wichtiger Zellfunktionen hin. Die Tatsache, dass das EHEC-Hämolysin eng mit *stx*-positiven HUS Patienten assoziiert ist, unterstützt diese Vermutung zusätzlich (56).

Wichtige phänotypische Eigenschaften der *E. coli* sind die Zuckerfermentation und die Antibiotikaresistenz. Die klassische, phänotypische Identifizierung von *E. coli* erfolgt anhand des Nachweises typischer biochemischer Eigenschaften: Abbau von Mannit, Laktose und Glukose (unter Gasbildung), Indolbildung, fehlende Zitratverwertung und negative Voges-Proskauer-(VP)-Reaktion (Acetoinbildung). Durch die inkongruente Fermentation (Verstoffwechselung) von Rhamnose, Sorbitol und der Telluritresistenz können einzelne *E. coli* Serovare phänotypisch voneinander abgegrenzt werden. So sind EHEC O157:H7 nicht in der Lage, Sorbitol zu fermentieren (44). *E. coli* der Serogruppe O26 fermentieren keine Rhamnose, zeigen jedoch telluritresistentes Wachstum (32, 65). Diese Resistenz der *E. coli* gegen Tellurit korreliert eng mit dem Nachweis des *ter*-Gens (7, 68).

Die Zunahme von Antibiotikaresistenzen innerhalb der Spezies *E. coli* stellt ein wachsendes Problem dar (15). Bei vielen durch *E. coli* verursachten Infektionen wie unkomplizierten Zystitiden und Pyelonephritiden, sind z.B. Trimethoprim-Sulfamethoxazole und Cephalosporine der dritten Generation angezeigt (58). Obwohl bei *stx*-positiven *E. coli* eine antibiotische Therapie kontraindiziert ist, zeigen 40% der STEC eine Resistenz gegen Trimethoprim-Sulfamethoxazole (58). Durch Testung der Antibiotikaresistenz als phänotypische Eigenschaft werden weitere Vergleiche der untersuchten *E. coli* O26 Stämme ermöglicht.

2 Zielsetzung

Sind EHEC und aEPEC Stämme der Serogruppe O26 enger miteinander verwandt als bisher angenommen? Durch Multilocus Enzymelektrophorese bzw. Sequenztypisierung von Haushaltsgenanalysen konnte bereits gezeigt werden, dass viele chromosomale Regionen gemeinsam in EHEC und aEPEC O26 Stämmen vorliegen (17, 51, 72). In dieser Studie wurden EHEC und aEPEC O26:H11 sowohl phänotypisch als auch genotypisch vergleichend untersucht, um pathogenitätsrelevante Gene zu identifizieren und phylogenetische Zusammenhänge feststellen zu können. Die Typisierungsergebnisse sollen für epidemiologische Fragestellungen, aber auch zur klinischen Einschätzung des Erkrankungsverlaufs eingesetzt werden.

Trotz der großen Bedeutung als menschliche Krankheitserreger existiert bis zum heutigen Zeitpunkt keine Routinediagnostik, die beide, EHEC und aEPEC O26 Stämme, sicher nachweist, weswegen auch Aspekte zur Etablierung eines Isolationsmediums in diese Arbeit miteinbezogen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft der verwendeten *E. coli* Stämme

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden der Stammsammlung von Herrn Prof. Dr. H. Karch, Institut für Hygiene, Münster, entnommen. Es wurden fünf Paare *E. coli* der Serogruppe O26:H11, d.h. insgesamt zehn Stämme, untersucht. Diese wurden zwischen 1997 bis 1999 aus je zwei konsekutiven Stuhlproben von fünf Patienten isoliert. Das erste Isolat zeigte sich jeweils Shiga Toxin-positiv und das zweite Shiga Toxin-negativ (d.h. Stuhlprobe 1 = EHEC und Stuhlprobe 2 = aEPEC) (s. Tabelle 2).

Als Kontrollstämme dienten die in Tabelle 3 aufgeführten Stämme.

Tabelle 2: Aufführung der untersuchten *E. coli* Isolate

Für die Stuhlproben ist jeweils die Isolatnummer sowie die Fähigkeit der Shiga Toxinproduktion angegeben.

| Patient | Stuhlprobe | Isolatnummer | Stx-Produktion |
|---------|------------|--------------|----------------|
| A | 1 | 1530/99 (A1) | ja |
| | 2 | 1676/99 (A2) | keine |
| B | 1 | 5917/97 (B1) | ja |
| | 2 | 318/98 (B2) | keine |
| C | 1 | 1531/99 (C1) | ja |
| | 2 | 1677/99 (C2) | keine |
| E | 1 | 1532/99 (E1) | ja |
| | 2 | 1679/99 (E2) | keine |
| F | 1 | 249/98 (F1) | ja |
| | 2 | 257/98 (F2) | keine |

Tabelle 3: Die verwendeten Kontrollstämme und deren Serogruppe:

| Isolatnummer | Serogruppe |
|--------------|------------|
| E-D31 | O111:H- |
| DEC-8B | O111:H- |
| EDL-933 | O157:H7 |
| PMK 3 | O103:H2 |
| 6061/96 | O26:H11 |
| 5021/97 | O26:H- |
| C 600 | |
| 5021/97 | O26:H11 |
| 356/99 | O26:H11 |
| 1541/01 | O26:H11 |
| EO2/695 | O26:H11 |

3.1.2 Definition der Erkrankungen

Patienten mit Durchfall hatten mehr als drei wässrige Stuhlfrequenzen pro Tag, - blutig oder unblutig. HUS wurde als Kombination folgender Symptome festgelegt: mikroangiopathische hämolytische Anämie (Hämatokrit unter 30%), Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl unter $150.000/\text{mm}^3$) und renale Insuffizienz (Serumkreatinin über dem höchstzulässigen Wert dem Patientenalter entsprechend).

3.1.3 Geräte

| | |
|--------------------------------|----------------------------|
| Vortexer | Bender und Hobein, Schweiz |
| Densimat | Biomérieux, Nürtingen |
| Flachbodengläser | Schott AG, Mainz |
| Brutschrank | Heraeus, Hanau |
| Sicherheitswerkbank | Heraeus, Hanau |
| Thermocycler, Version 1.259 | BioRad, München |
| TGradient 96 | Biometra, Göttingen |
| Zentrifuge, MiniSpin | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|--|--|
| Kolbenhubpipette | Eppendorf, Reference mit wählbarer Volumeneinstellung, Hamburg |
| Magnetrührer MR 3001 | Heidolph, Schwabach |
| Spannungsgerät | Consort E 143 |
| Waage | Scout II OHAUS |
| Foto-Dokumenations- anlage | Kaiser, Hitachi, Mitsubishi |
| Giesstand PhorCasterMidi | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| Flachgelelektrophoreseeinheit, Comphor Midi | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| Geldokumentationsanlage, GelDoc2000 | BioRad, Hercules (CA/USA) |

3.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|--|
| Ösen | Nunc™, Roskilde, Dänemark |
| API-SET | Biomérieux, Nürtingen |
| Jamesreagenz° | Biomérieux, Nürtingen |
| TDA-Reagenz | Biomérieux, Nürtingen |
| VP1 und VP2 | Biomérieux, Nürtingen |
| Parafinum | Biomérieux, Nürtingen |
| Isotone Kochsalz-Lösung | Eigenherstellung des Instituts für Med. Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster |
| Antibiotika | Oxoid, Wesel |
| Müller-Hinton-Agarplatte | Heipha, Eppelheim |
| Endoagarplatte | Heipha, Eppelheim |
| Colombia-Blutagar | Heipha, Eppelheim |
| Sorbitolhaltiger McConkey-Agar mit Cefixime und Tellurit (CT-SMAC) | Firma Oxoid, Hampshire |

| | |
|--|---|
| Rhamnosehaltiger McConkey-Agar mit Cefixime und Tellurit (CT-RMAC) | Firma Sifin, Berlin |
| Reaktionspuffer Y | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| Enhancer Solution P | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| dNTP-Mix (Desoxyribonukleotide) | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| Primer | Sigma ARK, Darmstadt |
| Taq-DNA-Polymerase | PEQLAB Biotechnologie, Erlangen |
| passiv reverse Verotoxin- producing <i>E. coli</i> Latex Agglutination | Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan |
| Sterile Wattestäbchen und Aqua destillata | Eigenherstellung des Instituts für Hygiene, Universitätsklinikum Münster |
| Molekulargewichtsstandard 1-kbp ladder/100bp ladder | Initrogen, Carlsbad/USA |
| Xylencyanol | Merck, Darmstadt |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| BMA SeaKem LE-Agarose | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| Trisborat-EDTA-Puffer (TBE) | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | BioRad, Hercules (CA/USA) |
| Tris Ultra Qualität | Roth, Karlsruhe |
| EDTA (Ethylendiamintetraacetat) | Sigma Aldrich, Deisenhofen |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| Purified BSA | New England Biolabs |
| Restriktionsendonuklease <i>Hha I</i> | New England Biolabs |

Es wurden Standard-Kunststoffmaterialien von den Firmen Eppendorf (Hamburg) und Vitlab (Landmark Scientific Inc. USA) benutzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Phänotypische Untersuchung

3.2.1.1 API 20 E

Der API 20 E ist ein standardisiertes System zur Identifizierung gramnegativer, nicht anspruchsvoller Stäbchen anhand biochemischer Reaktionen. Zunächst wird eine 0,5 McFarland (Einheit zur Konzentration der Bakterien in der Flüssigkeit) Keimsuspension aus Aqua destilata und einer auf Colombia-Blutagar 18-24 Stunden gewachsenen Bakterienkolonie hergestellt. Die Feuchtkammer des API-Sets wird mit H₂O gefüllt und der dazugehörige Teststreifen eingelegt. Anschließend werden die 20 Mikroreagenzröhrchen mit der Bakteriensuspension beimpft, wobei alle Reaktionen, die in Tabelle 4 mit * gekennzeichnet sind, mit Paraffinöl abgedeckt werden. Die in Tabelle 4 unterstrichenen Reaktionen werden bis zum Becher vollständig aufgefüllt. Nach einer Inkubation über 24 Stunden bei 37°C werden zu folgenden Mikroröhrchen weitere Reagenzien zugefügt:

- TDA (= Prüfung auf biochemische Reaktion von Tryptophan): erhält TDA-Reagenz
- IND (= Prüfung auf biochemische Reaktion von Indol): erhält James-Reagenz
- VP (= Prüfung auf biochemische Reaktion von Acetoin): erhält VP 1 und VP 2, Beurteilung der Farbreaktion erst nach 10 min.

Die während der Inkubation entstandenen Stoffwechselprodukte bewirken Farbumschläge, entweder direkt oder nach der Reagenzzugabe. Anhand der folgenden Ablesetabelle (Tabelle 4) werden die Reaktionen bestimmt und durch eine Identifizierungssoftware mit Hilfe eines numerischen Profils analysiert.

Tabelle 4: Bestandteile und Auswertungsrichtlinien des API 20 E Tests

| Test* | Aktive Bestandteile | Menge (mg/vert.) | Reaktionen/Enzyme | Ergebnisse | |
|-----------------------|---|------------------|---------------------------|------------------------------|---|
| | | | | Negativ | Positiv |
| ONPG | 2-Nitrophenyl- β D-Galaktopyranosid | 0,223 | β -Galaktosidase | Farblos | Gelb |
| <u>ADH</u> | L-Arginin | 1,9 | Arginindihydrolase | Gelb | Rot/Orange |
| <u>LDC</u> | L-Lysin | 1,9 | Lysindecaboxylase | Gelb | Rot/Orange |
| <u>ODC</u> | L-Ornithin | 1,9 | Ornithin-decarboxylase | Gelb | Rot/Orange |
| CIT* | Trinatriumcitrat | 0,756 | Citratverwertung | Hellgrün/ Gelb | Blau-Grün/ Blau |
| <u>H₂S</u> | Natriumthiosulfat | 0,075 | H ₂ S-Bildung | Farblos/ Grau | Schwarzer Nieder- schlag |
| <u>URE</u> | Harnstoff | 0,76 | Urease | Gelb | Rot/Orange |
| TDA | L-Tryptophan | 0,38 | Tryptophan- desaminase | Gelb | Rotbraun |
| IND | L-Tryptophan | 0,19 | Indolbildung | Farblos Hellgrün/ Gelb | Rosa |
| VP* | Natriumpyrovat | 1,9 | Acetoinbildung | Farblos | Rosa/Rot |
| GEL* | Gelantine | 0,6 | Gelatinase | Keine Diffusion | Diffusion der schwarzen Tusche |
| GLU | D-Glukose | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb/ Gelbgrau |
| MAN | D-Mannit | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| INO | Inosit | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| SOR | D-Sorbit | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| RHA | L-Rhamnose | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| SAC | D-Saccharose | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| MEL | D-Melibiose | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| AMY | Amygdalin | 0,57 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| ARA | L-Arabinose | 1,9 | Fermentation | Blau/ Blau-Grün | Gelb |
| OX | Oxidase | | Cytochromoxidase | Siehe Oxidaseanleitung | |

(* Bedeutung der Abkürzungen siehe Kapitel 3.1.1)

Oxidasetest: Auf ein Filterpapier wird ein Tropfen Oxidasereagenz gegeben und anschließend die zu testende Bakterienkolonie aufgetragen. Ein blauer Farbumschlag der Kolonie kennzeichnet eine positive Reaktion.

Neben den fünf korrespondierenden Bakterienpaaren (s. Tabelle 4) wurden die folgenden vier *E. coli* Stämme in der API 20 E Reihe als Kontrollen mituntersucht:

- EO2/695 (O26:H11)
- 356/99 (O26:H11)
- 5021/97 (O26:H11)
- 1541/01 (O26:H11)

3.2.1.2 Agardiffusionstest

Mit Hilfe der Agardiffusion wird die Antibiotikaempfindlichkeit eines Erregers untersucht. Eine 0,5 McFarland Bakteriensuspensionslösung wird im Rasenausstrich mit einem sterilen Wattetupfer auf eine Müller-Hinton (MH)-Agar-Platte beimpft. Anschließend werden mit einer definierten Menge von Antibiotika imprägnierte Filterscheiben steril auf die MH-Agar-Platte gelegt. Die Beschickung der Scheiben ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Platten inkubieren bei 37°C für ca. 20 Stunden. Danach wird der Hemmhofdurchmesser in mm abgelesen und nach der DIN 58959/14 1997-06 (NCCLS) ausgewertet. Entsprechend dieser Richtlinie erfolgt eine Einteilung der Keime in sensibel, intermediär oder resistent (siehe Tabelle 5). Ein Vergleich des Resistenzverhaltens der getesteten *E. coli* Stämme ist nun möglich.

Tabelle 5: Bewertung der Hemmhofgröße (mm) des Agardiffusionstests auf MH-Agar nach DIN 58959/14 1997-06 für gramnegative Stäbchen

| Antibiotikum | Abkürzung | Beschickung (µg) | Sensibel ≥ | Intermediär Sensibel | Resistent |
|------------------------------|-----------|------------------|------------|----------------------|-----------|
| Ampicillin | AMP | 10 | 22 | 15-21 | 14 |
| Amoxicilin/ Clavulansäure | AMC | 30 | 28 | 21-27 | 20 |
| Piperacillin | PRL | 30 | 22 | 13-21 | 12 |
| Cefuroxim | CXM | 30 | 25 | 19-24 | 18 |
| Cefotaxim | CTX | 30 | 23 | 15-22 | 14 |
| Ceftazidim | CAZ | 10 | 16 | 11-15 | 10 |
| Cefsoludin | CFS | 30 | 29 | 19-28 | 18 |
| Erythromycin | E | 15 | 21 | 17-20 | 16 |
| Imipenem | IPM | 10 | 23 | 20-22 | 19 |
| Tetracyclin | TE | 30 | 22 | 17-21 | 16 |
| Gentamicin | CN | 10 | 21 | 15-20 | 14 |
| Tobramycin | TOB | 10 | 19 | 16-18 | 15 |
| Ofloxacin | OFX | 5 | 22 | 18-21 | 17 |
| Ciprofloxacin | CIP | 5 | 23 | 19-22 | 18 |
| Trim.- Sulfometoxacol | SXT | 25 | 16 | 11-15 | 10 |
| Colistin | CT | 10 | 11 | - | 8 |
| Mezlocilin | Mez | 30 | 23 | 17-22 | 16 |
| Amikacin | AK | 30 | 20 | 14-19 | 13 |
| Aztreonam | ATM | 30 | 28 | 20-27 | 19 |
| Rifampicin | RD | 30 | 20 | 17-19 | 16 |

3.2.1.3 Weitere phänotypische Untersuchungen

CT-SMAC/RMAC Zusammensetzung: Die von der Firma Oxoid, Hampshire verwendeten Spezialagarplatten enthalten je 2,5mg/l Potassium-Tellurit und 0,05mg/l Cefixime.

Anhand von CT-SMAC- (Sorbitol-haltigem McConkey-Agar mit Potassium-Tellurit und Cefixime) und CT-RMAC- (Rhamnose-haltigem McConkey-Agar mit Potassium-Tellurit und Cefixime) Platten konnte sowohl die Zuckerfermentation der *E. coli* Stämme als auch deren Telluritresistenz überprüft werden, wobei die Bakterien je 24 Stunden bei 35°C auf den jeweiligen Agarplatten bebrütet wurden. Auch die Referenzstämme O111:H- E-D31, O111:H- DEC-8B, O157:H7 EDL 933 und O103:H2 wurden hinsichtlich dieser

Stoffwechselleistungen getestet. Zum Nachweis der Hämolyse wurde Enterohämolysin-Agar genutzt, der aus 5% fibrinfreien und aufbereiteten, gewaschenen Schaf-Erythrozyten sowie 10mM CaCl₂ hergestellt wurde. Mittels eines kommerziellen Latex Agglutinationstestes konnte die Stx-Produktion nachgewiesen werden (passiv reverse Verotoxin-producing *E. coli* Latex Agglutination). Reinheitskontrollen wurden parallel auf Endo-Agar-Platten mitgeführt.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Aufgabe der Polymerasekettenreaktion (PCR) besteht darin, DNA-Sequenzen selektiv zu vervielfältigen. Hierzu müssen die Endsequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes bekannt sein, da ein zu diesen komplementärer Primer nötig ist. Zu Beginn erfolgt eine initiale Denaturierung der DNA-Doppelhelix für 5 min bei 94°C. Anschließend beginnt der zyklische Ablauf im ersten Schritt mit einer Denaturierung für 1 min bei 94°C, danach wird im zweiten Abschnitt durch eine Temperatursenkung das Anlagern (Annealing) der Primer an die einzelsträngige Template (= zu testende) -DNA möglich. Von diesen ausgehend synthetisiert die hitzestabile DNA-Polymerase (Taq) im dritten Schritt komplementäre DNA-Stränge in beide Richtungen. Dieser Zyklus wird im Allgemeinen 30mal wiederholt. Um zum Schluss die Reaktion zu vervollständigen, findet eine 5 minütige Polymerisation bei 72°C statt. Zu beachten ist die sorgfältige Auswahl der Annealing-Temperatur der Primer, da sie entscheidend für die Spezifität der Primer-Template-Bindung ist. Die Wahl richtet sich hauptsächlich nach der Länge und dem G/C-Gehalt des verwendeten Primers.

Der PCR-Ansatz (Mastermix) von 50 µl wurde nach folgendem Schema angesetzt:

| | |
|--|------|
| 10x Reaktionspuffer Y | 5µl |
| 5x Enhancer Solution P | 10µl |
| dNTP-Mix (10mM Stammlösung) | 1µl |
| Upstream Primer (aus 30mM Stammlösung) | 1µl |

| | |
|--|--------------------|
| Downstream Primer (aus 30mM Stammlösung) | 1µl |
| Taq-DNA-Polymerase | 0,26µl |
| Bakteriensuspension (DNA-Template) | 5µl |
| Aqua dest. | auf 50µl auffüllen |

Die Bakteriensuspension wurde aus einer frischen Einzelkolonie und 25µl 0,9% NaCl hergestellt. Tabelle 7 zeigt die verwendeten Primersequenzen, die Reaktionsbedingungen und die Größe des Produktes. Als Positivkontrolle zum Nachweis der Genabschnitte *hlyA*, *ter* und *stx* wurde der Referenzstamm *E. coli* EDL 933 (O157:H7) verwendet. *E. coli* 6061/96 (O26:H11) diente als Positivkontrolle für den Nachweis der Gene *fliC*, *eae-β* und *rfbO26*. Für den *eae-β*-Gennachweis wurde als zusätzliche Positivreferenz *E. coli* 5021/97 (O26:H-) festgelegt. Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR *E. coli* C600 verwendet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Aufführung der in der PCR genutzten Referenzstämme

Zu den jeweiligen Referenzstämmen ist der gesuchte Genabschnitt angegeben.

| Kontrollstämme | gesuchter Genabschnitt |
|-------------------------|-------------------------------|
| Positivkontrolle | |
| O157:H7, EDL 933 | <i>EhlyA</i> |
| O157:H7, EDL 933 | <i>stx</i> |
| O157:H7, EDL 933 | <i>ter</i> |
| O26:H11, 6061/96 | <i>fliC</i> |
| O26:H11, 6061/96 | <i>eae-β</i> |
| O26:H-, 5021/97 | <i>eae-β</i> |
| O26:H11, 6061/96 | <i>rfbO26</i> |
| Negativkontrolle | |
| C 600 | für alle gesuchten Genloci |

Sämtliche Stämme wurden auf das Vorhandensein folgender Pathogenitäts- und Widerstandsfaktoren untersucht:

- *stx₁B*
- *stx₂A, stx₂cA, stx₂dA, stx₂eA*
- EHEC-*hlyA*
- *eae*
- *eae-β*
- *ter F*

Zusätzlich wurde bei allen Bakterien eine Sicherung der Serotypie auf das Vorliegen des O26-(*rfbO26*) und des H11-(*fliC*) Genotyps durchgeführt.

Tabelle 7: PCR-Primer und –Bedingungen

Es werden für jeden verwendeten Primer sowohl die Zielsequenz als auch die benötigten PCR-Bedingungen angegeben.

| Primer | Primersequenz 5'-----3' | Ziel sequenz | PCR-Bedingungen | | | PCR- Produkt - länge (bp) | Referenz |
|--------|---|---|--------------------|------------------------------|---------------------|---------------------------------------|----------|
| | | | Denatu- rierung | Annealing | Amplifi- zierung | | |
| KS7 | ccc gga tcc atg aaa aaa aca tta tta ata | <i>stx₁B</i> | 94°C/ 30 sec | 52°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 40 sec | 258 | (21) |
| KS8 | gc ccc gaa ttc agc tat gag tca acg | | | | | | |
| LP43 | atc cta ttc ccg gga gtt tac g | <i>stx₂A</i> , <i>stx₂CA</i> , <i>stx₂dA</i> , <i>stx₂eA</i> | 94°C/ 30 sec | 57°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 90 sec | 584 | (14) |
| LP44 | gcg tca tcg tat aca cag gag c | | | | | | |
| HlyA1 | ggt gca gca gaa aaa gtt gta g | EHEC- <i>hlyA</i> | 94°C/ 30 sec | 57°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 90 sec | 1550 | (56) |
| HlyA4 | tct cgc ctg ata gtg ttt ggt a | | | | | | |
| FliC1 | caa gtc att aat ac(a/c) aac agc c | <i>flic</i> | 94°C/ 30 sec | 55°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 120 sec | 1464 | (43) |
| FliC2 | gac at(a/g) tt(a/g) ga(g/a/c) act tc(g/c) gt | | | | | | |
| SK1 | ccc gaa ttc ggc aca agc ata agc | <i>eae</i> | 94°C/ 30 sec | 52°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 60 sec | 863 | (55) |
| SK2 | ccc gga tcc gtc tcg cca gta ttc g | | | | | | |
| SK1 | ccc gaa ttc ggc aca agc ata agc | <i>eae-β</i> | 94°C/ 30 sec | 55°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 120 sec | 2287 | (76) |
| LP4 | ccc gtg ata cca gta cca att acg gtc | | | | | | |
| TerF1 | tta caa tcc gga caa aac a | <i>ter F</i> | 94°C/ 30 sec | 53°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 90 sec | 280 | (68) |
| TerF2 | caa tga caa cgg tga tcg | | | | | | |
| A1 | ctc tga tta tac aga agc a | <i>rfb O26</i> | 94°C/ 30 sec | 47°C/ 60 sec 30 Zyklen | 72°C/ 60 sec | 746 | (43) |
| A2 | agt cgt aat atg agc ttt tc | | | | | | |

bp = Basenpaare

3.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Kontrolle und Analyse der in der PCR entstandenen DNA-Amplifikate. Durch das elektrische Feld in den Elektrophoresekammern kommt es zur Wanderung der negativ geladenen DNA entsprechend ihrer Größe und Ladung in Richtung Anode (Plus-Pol) und somit zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente.

Zur Herstellung eines 1,5% Agaroseflachgels wird entsprechend Agarosepulver in 0,5fachem Trisborat-EDTA-Puffer (TBE) aufgekocht und so gegossen, dass ein 5 mm dickes Gel mit 10 bzw. 20 Taschen entsteht. 20µl des zu testenden Amplifikationsproduktes wurden mit 4µl eines 10fachen DNA-Probenpuffers (enthält Bromphenolblau) versetzt und zu je 10µl in diese Taschen pipettiert. Zusätzlich zu den PCR Produkten der zu untersuchenden Stämme wurde auf jedem Gel eine Positiv- und Negativkontrolle sowie ein Molekulargewichtsstandard („1kb ladder“) hinzugefügt.

Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 1,5 V/cm² für ca. 35 Minuten, bis die Bromphenolblau-Bande etwa 3/4 des Gels durchlaufen hatte. Danach erfolgte ein 20 minütiges Ethidiumbromid-Färbebad. Anschließend wurde das Gel in Aqua dest. gewaschen. Durch die Interkalierung des Farbstoffes in die DNA, fluoreszierten die Banden unter UV-Licht und konnten so ausgewertet bzw. zur Dokumentation fotografiert werden.

10x TBE-Puffer:

| | |
|-------------|--------|
| Tris Ultra: | 0,89 M |
| Borsäure: | 0,89 M |
| EDTA: | 25mM |

DNA-Probenpuffer (10fach):

| | |
|-----------------|-----------|
| Bromphenolblau: | 0,1%(w/v) |
| Xylencyanol: | 0,1%(w/v) |
| EDTA: | 25mM |
| Glycerin: | 50% (w/v) |

Ethidiumbromid-Färbebad:

200µl Ethidiumbromid in 50ml H₂O

3.2.4 Restriktionsanalyse

Zur weiteren Analyse der PCR-Fragmente wurde die DNA mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten. Diese Nukleasen erkennen eine Zielsequenz von mindestens vier Basenpaaren und trennen dort hydrolytisch die Phosphodiesterbindung des DNA-Doppelstranges.

Für die Analyse des in der PCR entstanden *fliC*-Fragments (siehe Tabelle 7, aus Kapitel 2.2.2) wurde aus folgenden Komponenten der zu verdauende Ansatz hergestellt:

- 15,0µl Amplifikat
- 2,0µl NE Puffer 4 (10x)
- 2,0µl Purified BSA 100x
(10mg/ml) verdünnt 1:10
- 1,0µl *Hha I* (20.000 U/ml)

Die Proben inkubierten 2 Stunden bei 37°C. Nach Zugabe von je 2µl Stop-Mix wurden die Proben in einer Gelelektrophorese (siehe **2.2.3**) auf 2% Agarosegel getrennt und ausgewertet.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, durch molekularbiologische und phänotypische Untersuchungen Zusammenhänge im Verwandtschaftsgrad von EHEC und atypischen EPEC einer Serogruppe feststellen zu können, die aus konsekutiven Stuhlproben derselben Patienten isoliert werden konnten. Zudem werden Aspekte zur Etablierung eines Isolationsmediums für *E. coli* der Serogruppe O26 miteinbezogen. Sämtliche verwendete *E. coli* Stämme wurden hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens mit unterschiedlichen Antibiotika, der Zuckerfermentation, weiterer biochemischer Reaktionen im API 20 E und dem Vorliegen der in 2.2.2 aufgeführten Pathogenitäts- und Widerstandsfaktoren untersucht. Des Weiteren wurde phänotypisch die Genexpression der Gene *ter* und *hlyA* überprüft.

4.1 Phänotypische Untersuchung

4.1.1 Darstellung der biochemischen Reaktionen im API 20 E

Wie erwartet zeigten die verwendeten O26:H11 Stämme die für *E. coli* typischen biochemischen Reaktionen: Fermentation von Glucose (unter Gasbildung), D-Mannit, D-Sorbit, D-Saccharose, D-Melibiose und L-Arabinose, Zudem kam es zur Indolbildung und negativer Voges-Proskauer-(VP)-Reaktion. Die Zitratverwertung fehlte (siehe Abb. 2).



Abbildung 2: API 20 E Testergebnisse des Bakterienstamms 318/98 (Probe B2) . Die Gefäße 1 bis 20 untersuchen die verwendeten *E. coli* Stämme auf Enzyme und Zuckerfermentation. Dies bildet eine Grundlage der taxonomischen Bestimmung. Gefäß 1: β -Galaktosidase (ONPG), Gefäß 2: Arginindihydrolase (ADH), Gefäß 3: Lysin-Decarboxylase (LDC), Gefäß 4: Ornithin-Decarboxylase (ODC), Gefäß 5: Citratverwertung (CIT), Gefäß 6: Schwefelwasserstoff (H_2S), Gefäß 7: Urease (URE), Gefäß 8: Tryptophan-Desaminase (TDA), Gefäß 9: Indolbildung (IND), Gefäß 10: Acetoinbildung (VP), Gefäß 11: Gelatinase (GEL), Gefäß 12: D-Glucose (GLU), Gefäß 13: D-Mannit (MAN), Gefäß 14: Inosit (INO), Gefäß 15: D-Sorbit (SOR), Gefäß 16: L-Rhamnose (RHA), Gefäß 17: D-Saccharose (SAC), Gefäß 18: D-Melibiose (MEL), Gefäß 19: Amygdalin (AMY), Gefäß 20: L-Arabinose (ARA).

Wie in Tabelle 8 ersichtlich, verhalten sich die korrespondierenden *E. coli* Stämme der Isolate eines Individuums (Stämme A1 / 2, B1 / 2, C1 / 2, E1 / 2, F1 / 2) in Bezug auf die durchgeführten biochemischen Reaktionen identisch. Auch wurden sämtliche untersuchten Stämme nach Erstellung des numerischen Profils mit einer Sicherheit von 99,8% von der Identifizierungssoftware als *E. coli* identifiziert.

Die biochemischen Reaktionen der vier Kontrollstämme 5021/97, 356/99, 1541/01 und EO2/695 zeigten im API 20 E geringfügige Unterschiede, welche Tabelle 9 zu entnehmen sind. Sie konnten von der Identifizierungssoftware ebenfalls zu 99,9 % als *E. coli* identifiziert werden.

Tabelle 8: Ergebnisse der Testungen der *E. coli* O26:H11 Isolate mittels API 20 E Testsystem

| bio-chemische* Reaktionen | <i>E. coli</i> O26:H11 Isolate | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | A1 | A2 | B1 | B2 | C1 | C2 | E1 | E2 | F1 | F2 |
| ONPG | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ADH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| LDC | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ODC | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| CIT | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| H2S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| URE | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TDA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IND | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| VP | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GEL | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GLU | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MAN | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| INO | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| SOR | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RHA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| SAC | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MEL | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AMY | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ARA | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| OX | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+ = positive Reaktion, d.h. Enzym oder fraglicher Stoffwechsel sind vorhanden
 - = negative Reaktion, d.h. Enzym oder fraglicher Stoffwechsel sind nicht vorhanden

*Abkürzungen der biochemischen Reaktionen siehe Unterschrift zu Abb 6

Tabelle 9: Ergebnisse der Testungen der Kontrollstämme mittels API 20 E Testsystem

| bio-chemische * Reaktionen | <i>E. coli</i> O26:H11 Isolate | | | |
|----------------------------|--------------------------------|--------|---------|---------|
| | 5021/97 | 356/99 | 1541/01 | E02/695 |
| ONPG | + | + | + | + |
| ADH | - | - | - | - |
| LDC | + | + | + | + |
| ODC | + | + | - | + |
| CIT | - | - | - | - |
| H2S | - | - | - | - |
| URE | - | - | - | - |
| TDA | - | - | - | - |
| IND | + | + | + | + |
| VP | - | - | - | - |
| GEL | - | - | - | - |
| GLU | + | + | + | + |
| MAN | + | + | + | + |
| INO | - | - | - | - |
| SOR | + | + | + | + |
| RHA | - | - | + | + |
| SAC | + | + | - | - |
| MEL | + | + | - | + |
| AMY | - | - | - | - |
| ARA | + | + | + | + |
| OX | - | - | - | - |

+ = positive Reaktion, d.h. Enzym oder fraglicher Stoffwechsel sind vorhanden
 - = negative Reaktion, d.h. Enzym oder fraglicher Stoffwechsel sind nicht vorhanden

* Abkürzungen der biochemischen Reaktionen siehe Unterschrift zu Abb 6

4.1.2 Resistenzverhalten im Agardiffusionstest

Im Agardiffusionstest wurde nach NCCLS (siehe Tabelle 5, Kapitel 2) eine Zuordnung der Stämme in resistent, intermediär-sensibel und sensibel auf das jeweilige Antibiotikum vorgenommen (siehe Abb. 3). Tabelle 10 zeigt die

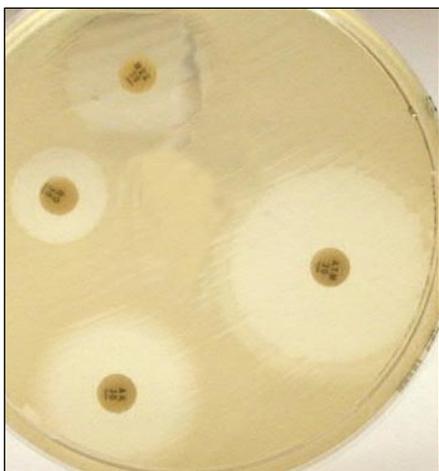


Abbildung 3: Hemmhofbildung des Isolats B2 (318/98) im Agardiffusionstest mit folgenden Antibiotika: AK:Amikain, Mez: Mezlocilin, ATM: Aztreonam, RD: Rifampicin.

Ergebnisse als Mittelwert aus drei Versuchsreihen. Die *E. coli* Stämme O26:H11, A1/2, B1/2, C1/2, E1/2 und F1/2 reagieren ohne Ausnahme sensibel auf: Piperacillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Imipenem, Tetracyclin, Tobramycin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Trim.-Sulfometoxacol, Colistin, Mezlocilin, Amikacin und Aztreonam. Sie sind resistent gegen Cefsoludin sowie Erythromycin und verhalten sich intermediär-sensibel bei folgenden Antibiotika: Ampicillin, Amoxicilin, Cefuroxim, Gentamicin und Rifampicin.

Im Agardiffusionstest zeigen demnach die korrespondierenden *E. coli* Isolate der Gruppe 1 (EHEC) als auch diejenigen aus Gruppe 2 (aEPEC) dasselbe Verhalten bezüglich der jeweiligen Antibiotika.

Tabelle 10: Resistenzbestimmung der *E. coli* O26:H11 Isolate mittels Agardiffusionstest

Angaben der Hemmhofgröße in mm, Mittelwerte aus drei Versuchsreihen.

| Antibiotika/ Wirkstoff | <i>E. coli</i> O26:H11 Isolate | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | A1 | A2 | B1 | B2 | C1 | C2 | E1 | E2 | F1 | F2 |
| Rifampicin | 17,6 | 18,3 | 16,7 | 17,3 | 19,7 | 18,0 | 17,7 | 17,3 | 18,3 | 16,3 |
| Ampicillin | 20,5 | 21,0 | 20,0 | 20,0 | 19,7 | 19,3 | 18,7 | 19,0 | 19,3 | 20,5 |
| Amoxicillin/ Clavulansäure | 21,3 | 23,3 | 22,3 | 21,7 | 21,0 | 21,5 | 21,0 | 21,7 | 21,7 | 20,7 |
| Piperacillin | 23,6 | 24,3 | 24,0 | 24,3 | 23,7 | 24,3 | 24,0 | 23,8 | 24,0 | 25,3 |
| Cefuroxim | 22,6 | 23,6 | 22,3 | 23,7 | 23,3 | 22,3 | 23,3 | 22,7 | 23,5 | 24,7 |
| Cefotaxim | 32,0 | 32,0 | 32,3 | 31,7 | 31,7 | 31,7 | 32,3 | 32,0 | 31,7 | 32,7 |
| Ceftazidim | 29,0 | 29,6 | 30,0 | 30,8 | 30,2 | 30,0 | 29,3 | 29,7 | 29,3 | 30,0 |
| Cefsoludin | 14,3 | 13,3 | 13,0 | 13,0 | 13,3 | 13,3 | 12,7 | 12,3 | 13,0 | 13,3 |
| Erythromycin | 10,6 | 10,3 | 9,3 | 11,0 | 10,3 | 11,3 | 10,7 | 10,7 | 11,7 | 13,0 |
| Imipenem | 29,3 | 29,0 | 30,3 | 30,3 | 29,7 | 29,2 | 29,0 | 29,3 | 30,7 | 30,0 |
| Tetracyclin | 25,0 | 25,6 | 25,7 | 25,0 | 26,0 | 25,3 | 25,7 | 25,7 | 25,7 | 26,0 |
| Gentamicin | 19,3 | 19,1 | 19,0 | 20,0 | 20,0 | 19,5 | 20,2 | 20,0 | 20,3 | 20,0 |
| Tobramycin | 19,0 | 18,8 | 19,7 | 19,3 | 20,0 | 19,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 19,7 |
| Ofloxacin | 26,6 | 29,3 | 31,0 | 31,3 | 31,7 | 31,7 | 31,0 | 29,0 | 27,0 | 30,0 |
| Ciprofloxacin | 31,0 | 33,6 | 36,3 | 35,7 | 33,0 | 32,7 | 33,7 | 32,7 | 31,7 | 32,7 |
| Trimeth.- Sulfa- methoxazol | 27,6 | 29,0 | 29,3 | 30,7 | 30,7 | 29,0 | 29,0 | 29,7 | 28,7 | 28,7 |
| Colistin | 13,3 | 13,0 | 13,0 | 13,5 | 14,0 | 13,0 | 13,7 | 13,0 | 13,0 | 14,0 |
| Mezlocillin | 23,0 | 25,0 | 23,8 | 24,2 | 24,3 | 23,7 | 23,7 | 23,5 | 26,0 | 24,7 |
| Amikacin | 20,3 | 20,0 | 20,2 | 21,0 | 20,3 | 20,8 | 21,7 | 21,0 | 21,3 | 20,0 |
| Aztreonam | 30,6 | 30,3 | 30,7 | 30,3 | 30,0 | 30,7 | 30,3 | 30,3 | 31,7 | 30,7 |

4.1.3 Untersuchung auf Hämolyse, Sorbitol- bzw. Rhamnosefermentation und Telluritresistenz

Wie in Tabelle 11 ersichtlich, verstoffwechseln sämtliche untersuchten O26 Stämme und die Kontrollstämme DEC-8B (O111:H-), E-D31 (O111:H-) und PMK 3 (O103:H2) bis auf den Kontrollstamm EDL 933 (O157:H7) Sorbitol, wohingegen Rhamnose nur von den Kontrollstämmen, nicht aber von den untersuchten Paaren der *E. coli* O26 Stämme fermentiert wird. Erwartungsgemäß waren die untersuchten Bakterienisolate der Gruppe 1 (*stx*-positiv, A1 – F1) resistent gegenüber Tellurit. Auch die aEPEC Isolate der Gruppe zwei (A2 – F2) zeigten telluritresistentes Wachstum (siehe Abb. 4). Die Fähigkeit zur Hämolyse konnte bei allen untersuchten *E. coli* Stämmen A1 bis F2 festgestellt werden. Bezüglich der oben aufgeführten Eigenschaften ist demnach phänotypisch kein Unterschied zwischen den Bakterienstämmen der ersten (A1-F1) und der zweiten (A2-F2) Gruppe festzustellen.



Abbildung 4: Tellurit-resistentes Wachstum und Fermentation der Bakterienprobe F2 (257/98) auf CT-SMAC.

Tabelle 11: Ergebnisse der Untersuchungen der *E. coli* O26:H11 Isolate auf Hämolyse, Telluritresistenz und Sorbitol- bzw. Rhamnosefermentation

| <i>E. coli</i> O26:H11 Isolate | Fermentation auf CT-SMAC | Fermentation auf CT-RMAC | Hämolyse | Tellurit Resistenz |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|--------------------|
| Stammnummer | | | | |
| A1 | + | - | + | + |
| A2 | + | - | + | + |
| B1 | + | - | + | + |
| B2 | + | - | + | + |
| C1 | + | - | + | + |
| C2 | + | - | + | + |
| E1 | + | - | + | + |
| E2 | + | - | + | + |
| F1 | + | - | + | + |
| F2 | + | - | + | + |
| Kontrollstämmen | | | | |
| E-D31 (O111:H-) | + | + | nicht geprüft | + |
| DEC-8B (O111:H-) | + | + | nicht geprüft | + |
| EDL 933 (O157:H7) | - | + | nicht geprüft | + |
| PMK 3 (O103:H2) | + | + | nicht geprüft | + |

+ = positive Reaktion/ Fermentation bzw. Wachstum hat stattgefunden

- = negative Reaktion/ keine Fermentation bzw. kein Wachstum

CT-SMAC = Sorbitolhaltiger McConkey-Agar mit Cefixime und Tellurit

CT-RMAC = Rhamnosehaltiger McConkey-Agar mit Cefixime und Tellurit

4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

4.2.1 Sicherung der Serotypie

Zur Sicherung der dokumentierten Serotypisierung wurde bei sämtlichen *E. coli* Stämmen der Patientenisolate mittels PCR das Vorliegen eines O26 (*rfbO26*) und eines H11 (*flic-RFLP*) Genotyps untersucht. Die genannten *E. coli* waren für *rfbO26* positiv, so dass die Zugehörigkeit zum O26 Komplex gesichert werden konnte.

Das RFLP Muster der *fliC*-Produkte entsprach bei jedem dieser *E. coli* Stämme dem des Referenzstammes 6061/96, während der Stamm C 600 andere Fragmente zeigte. Hierdurch wurde das Vorliegen des H11-Genotyps bestätigt (siehe Tabelle 12 und Abb. 5).

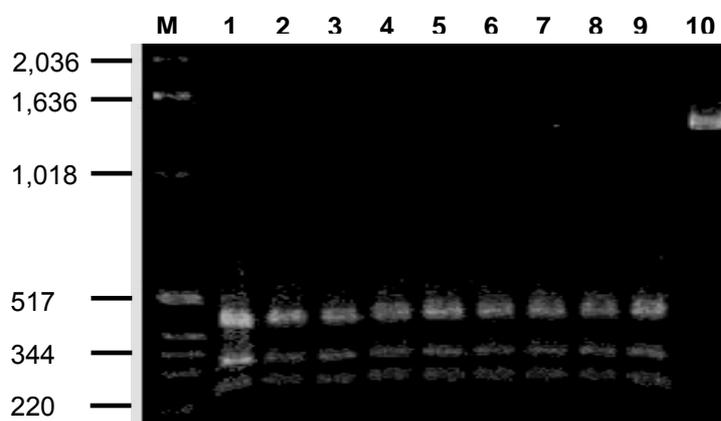


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Analyse des PCR-Produkts *fliC* und der anschließenden Restriktionsanalyse von neun untersuchten Patientenisolaten (Serotyp O26:H11). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines 2 %-Agarosegels. M=Molekulargewichtsstandard in Basenpaaren (bp) (1000 bp). Spur 1: Positivkontrolle (Isolatnummer: 6061/96), Spur 2: B1 (5917/97), Spur 3: B2 (318/98), Spur 4: C1 (1531/99), Spur 5: C2 (1677/99), Spur 6: E1 (1532/99), Spur 7: E2 (1679/99), Spur 8: F1 (249/98), Spur 9: F2 (257/98), Spur 10: Positivkontrolle 6061/96. Durch die PCR entsteht in der Positivkontrolle 6061/96 die erwartete Fragmentgröße von 1464 bp des *fliC*-Gens. Der Restriktionsverdau wurde mittels der Endonuklease *Hha* I durchgeführt. Schnittstellen und Fragmentgrößen sind Tabelle 12 zu entnehmen. Im Kontrollgel konnten die untersuchten *E. coli* Stämme als H11 Genotyp identifiziert werden.

Tabelle 12: Fragmentgrößen und Schnittstellen des Enzyms *Hha* I in dem *fliC*-Gen (1464 bp) der untersuchten O26:H11 Isolate.

| Schnittstelle bp | Fragmentgröße bp |
|------------------|------------------|
| 166 | 166 |
| 184 | 18 |
| 473 | 289 |
| 475 | 2 |
| 887 | 412 |
| 1324 | 437 |

4.2.2 Gendistribution von Pathogenitäts- und Widerstandsfaktoren

a) Nachweis des *eae-β*-Gens:

In sämtlichen untersuchten *E. coli* Stämmen O26:H11 (A1-F2) konnte das für Intimin β kodierende Virulenzgen *eae-β* nachgewiesen werden (siehe Abb. 6).

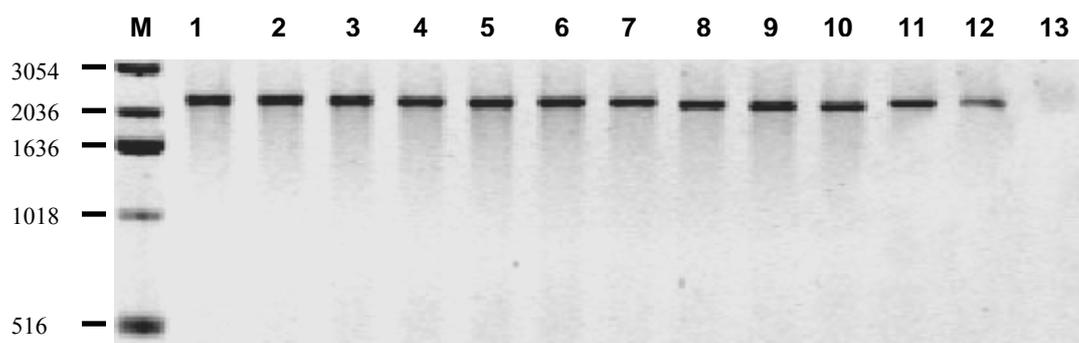


Abb. 6. Gelelektrophoretische Analyse des PCR-Produkts *eae-β* der zehn untersuchten Patientenisolat (Serotyp O26:H11). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines 1,5 % Agarosegels. M=Molekulargewichtsstandard (1000 bp) Spur 1: Patientenprobe A1 (Isolatnummer: 1530/99), Spur 2: A2 (1676/99); Spur 3: B1 (5917/97); Spur 4: B2 (318/98); Spur 5: C1 (1531/99); Spur 6: C2 (1677/99); Spur 7: E1 (1532/99); Spur 8: E2 (1679/99); Spur 9: F1 (249/98); Spur 10: F2 (257/98); Spur 11: Positivkontrolle I (6061/96); Spur 12: Positivkontrolle II (5021/97); Spur 13: Negativkontrolle (C 600). Durch die PCR entsteht in den zehn untersuchten Patientenisolaten die erwartete Fragmentgröße des *eae-β*-Gens von 2287 bp.

b) Nachweis weiterer Virulenzgene (*EhlyA*, *ter*, *stx_{1/2}*):

Ebenfalls positiv waren die untersuchten *E. coli* Stämme für das Toxin-kodierende *EhlyA* und das für die Telluritresistenz kodierende *ter*-Gen (Umweltwiderstandsfaktor). In den getesteten EHEC Stämmen A1, B1, C1, E1 und F1 (=Gruppe 1) konnte ausschließlich die Shiga Toxin-Variante *stx₂* nachgewiesen werden, wohingegen die Stämme A2, B2, C2, E2 und F2 (= Gruppe 2) **kein** *stx*-Gen enthielten.

Die Gendistribution der oben genannten Faktoren zeigt, dass das Vorhandensein des *stx₂*-Gens in den *E. coli* Stämmen der Gruppe 1 und dessen Fehlen in der zweiten Gruppe, den einzigen Unterschied zwischen diesen Gruppen darstellt. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung.

Tabelle 13: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der *E. coli* O26:H11 Isolate auf das Vorhandensein der Genabschnitte *rfbO26*, *fliC*, *stx*, *eae*, *EhlyA*, *ter*

| Patient | Isolat-nummer | <i>rfbO26</i> | <i>fliC</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>EhlyA</i> | <i>ter</i> |
|---------|---------------|---------------|-------------|------------|------------|--------------|------------|
| A | 1530/99 | + | H11 | 2 | β | + | + |
| | 1676/99 | + | H11 | - | β | + | + |
| B | 5917/97 | + | H11 | 2 | β | + | + |
| | 318/98 | + | H11 | - | β | + | + |
| C | 1531/99 | + | H11 | 2 | β | + | + |
| | 1677/99 | + | H11 | - | β | + | + |
| E | 1532/99 | + | H11 | 2 | β | + | + |
| | 1679/99 | + | H11 | - | β | + | + |
| F | 249/98 | + | H11 | 2 | β | + | + |
| | 257/98 | + | H11 | - | β | + | + |

5 Diskussion

Escherichia coli der Serogruppe O26:H11 werden, je nach Ausprägung ihrer Virulenz- bzw. phänotypischen Eigenschaften, entweder als atypische EPEC oder EHEC klassifiziert. Hauptunterschied zwischen aEPEC und EHEC ist die Fähigkeit zur Shiga Toxin-Produktion. aEPEC und EHEC beherbergen das für Intimin kodierende *eae*-Gen. Im Gegensatz zu typischen EPEC fehlt ihnen das EAF-Plasmid (EPEC adherence factor), welches für wichtige Adhäsionsmoleküle kodiert und über die Detektion des *bfp*-Gens identifiziert wird. Sowohl EHEC als auch aEPEC produzieren Hämolyysin. EHEC und atypischen EPEC der Serogruppe O26:H11 ist zudem ihr Hauptreservoir, das Rind, gemeinsam (29, 30), die Übertragung der Keime auf den Menschen erfolgt überwiegend durch kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser (5, 33, 37). Als Reservoir typischer EPEC dient dagegen ausschließlich der Mensch (48). *E. coli* O157:H7 ist weltweit mit den meisten HUS- Ausbrüchen assoziiert und präsentiert den Prototypen der enterohämorrhagischen *E. coli* (67). Auch EHEC der Serogruppe O26:H11 verursachen als häufigste non-O157:H7 Vertreter ernste Erkrankungen (21, 34, 60). Mitte der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde innerhalb der EHEC-Stämme ein neuer Serovar, O26:H11, identifiziert, der als Toxin ausschließlich Stx₂ produziert und sehr häufig zu HUS- Erkrankungen führt (74). Die Produktion von Stx₂ ist bei allen EHEC verschiedener Serogruppen am häufigsten mit schweren Krankheitsverläufen, besonders dem Auftreten des hämolytisch-urämischen Syndroms bei den Infizierten assoziiert (21, 23).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine phänotypische und genotypische Charakterisierung von aEPEC und EHEC der Serogruppe O26:H11 durchgeführt. Die Stämme unterschieden sich lediglich in der Fähigkeit zur Stx-Produktion. In den phänotypischen Untersuchungen zeigten diese Stämme bezüglich der Antibiotikaresistenz als auch in den biochemischen Reaktionen im API 20 E Test dasselbe Verhalten. Auch konnten keine Unterschiede im Wachstum auf CT-SMAC/RMAC Agarplatten oder der Fähigkeit zur Hämolyse

gefunden werden. Auf genotypischer Ebene wurde das Vorhandensein des EHEC-Plasmids durch den Nachweis des *hlyA*-Gens (56) und der „LEE Insel“ durch den *eae-β*-Genachweis in sämtlichen untersuchten *E. coli* Stämmen bestätigt (48). Das Gen *ter* war entsprechend den Ergebnissen des Wachstums auf Tellurit-enthaltenden Nährböden bei allen getesteten *E. coli* O26:H11 Serovaren vorhanden (68). Hinsichtlich des phänotypischen Verhaltens sämtlicher untersuchter *E. coli* Stämme dieser Studie waren **keine** Unterschiede nachzuweisen. Die Shiga Toxin-2-Produktion stellt die **einzig**e Abweichung zwischen den korrespondierenden *E. coli* Isolaten dar.

Nach Blank *et al.* (10) sind EHEC durch das Vorhandensein der „LEE Insel“, dem *hlyA*-Plasmid sowie deren Fähigkeit zur Shiga Toxin-Produktion und dem Fehlen des EAF-Plasmids definiert. Die Einteilung der aEPEC erfolgt anhand des Fehlens der Stx-Produktion sowie des Vorkommens der „LEE Insel“ und des *hlyA*-Plasmids. Im Gegensatz zu den typischen EPEC fehlt im Genom der aEPEC das EAF-Plasmid (10). Entsprechend dieser Definition ist anzunehmen, dass bei den untersuchten Patienten in dieser Studie eine Infektion mit dem EHEC O26:H11 Stamm erfolgte. In darauffolgenden Stuhlproben wenige Tage später wird in der Stuhlprobe derselben Patienten ausschließlich ein aEPEC der Serogruppe O26:H11 nachgewiesen. Als Ursache hierfür könnte eine Koinfektion der Patienten mit dem aEPEC O26:H11 Serotyp angenommen werden. Bei der vorliegenden phäno- und genotypischen Gleichheit der untersuchten Stämme mit Ausnahme der Stx₂-Produktion erscheint dies jedoch unwahrscheinlich. Daher muss es eine andere Erklärung für das Vorliegen der verschiedenen *E. coli* Serovare in den konsekutiven Patientenproben geben.

Die Zusammensetzung des Genoms der *E. coli* variiert stark und ist regelmäßigen Veränderungen durch horizontalen Gentransfer unterworfen (17). Durch den ständigen Gewinn bzw. Verlust von Genmaterial entwickelten sich die hoch virulenten EHEC und EPEC Stämme Berechnungen zufolge vor schätzungsweise 4,5 Millionen Jahren von einem gemeinsamen Vorläufer ausgehend (51). Die Virulenzfaktoren, welche zum großen Teil den Unterschied der Pathotypen der *E. coli* ausmachen, entstammen einer Vielzahl an Quellen

wie Plasmiden, Bakteriophagen und dem Genom anderer Bakterien. Durch den Erwerb mobiler Virulenzgene und deren Einbau in das fest etablierte Bakterienchromosom ist die genetische Vielfalt der heutigen pathogenen *E. coli* zu erklären. Zudem ermöglicht dieser Vorgang den Bakterienstämmen, neue pathogene Varianten zu bilden, die in weiteren Krankheitssymptomen für den Menschen münden können (17, 51).

Feng *et al.* (20) entwickelten auf der Basis der Multilocus Enzymelektrophorese ein phylogenetisches Modell zur Entstehung des heutigen *E. coli* O157:H7, wonach dessen Evolution von dem Serotyp O55:H7 ausgeht. Als gemeinsamer, vermuteter Ursprungstamm wird ein EPEC ähnlicher Vorläuferklon angenommen (20). Untersuchungen der Genstrukturen mittels Multilocus Enzymelektrophorese von Whittam *et al.* (72) hatten schon 1993 gezeigt, dass Serotyp O157:H7 trotz unterschiedlicher O-Serogruppe genetisch eng mit *E. coli* O55:H7 verwandt ist. In Anlehnung an dieses Evolutionsmodell entwickelten Donnenberg und Whittam (17) eine Hypothese zur Entstehung des Serovars O26:H11 (siehe Abb. 7). Hiernach stammen atypische EPEC und EHEC O26:H11 von einem gemeinsamen EPEC-ähnlichen Ursprungstamm ab. Die in der Abbildung 7 rechtsstehenden Serogruppen wurden als EHEC und EPEC Gruppe 2 definiert. Durch den Erwerb des *eae-β*-Gens und des

EAF-Plasmids konnte sich die Gruppe der typischen EPEC 2 (*E. coli* O111:H2 bzw. O128:H2) entwickeln, andererseits u.a. durch Gewinn der *stx*-Gene und des EHEC-Plasmids die Gruppe der EHEC 2 (*E. coli* O26:H11 bzw. O111:H8). Der Punkt A2 in der Abbildung 7 steht für den vermuteten Ursprungstamm des EPEC O26:H11, der durch den Erwerb einer Shiga Toxin-1-kodierenden Phage und dem EHEC-

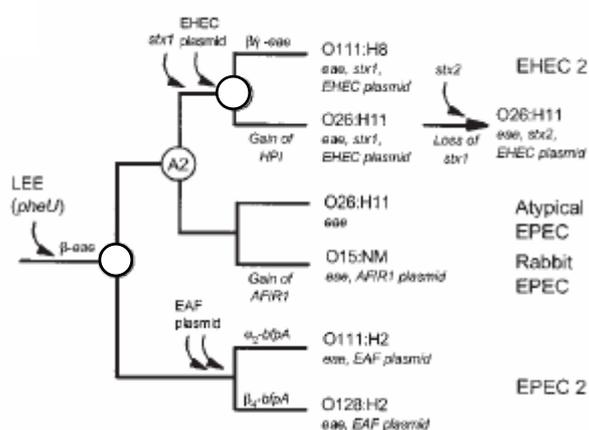


Abbildung 7: Evolutionsmodell der EPEC und EHEC Klon der Gruppe 2. Das Modell basiert auf der Existenz des LEE auf der pheU Einheit. Die Äste zeigen den Erwerb der definierenden Hauptvirulenzfaktoren der EHEC und EPEC (verändert nach Donnenberg *et al.*, 2001).

Plasmid u.a. die Entwicklung des EHEC O26:H11 ermöglichte. Ein genetischer Shift der Shiga Toxin-Variante 1 zu 2 führte zu dem heutigen Serovar O26:H11 (*stx*₂). Gleichzeitig entwickelt sich (von Punkt A2 aus in Abb. 7) der atypische EPEC O26:H11, welcher lediglich die „LEE Insel“ und das EHEC-Plasmid, nicht aber ein *stx*-Gen erwirbt (17).

Bereits 1996 konnten Giammanco *et al.* zeigen, dass die einzigen Differenzen der Virulenzfaktoren zwischen aEPEC und EHEC der Serogruppen O26, O111 und O128 das Vorhandensein von *stx*-Genen oder des EHEC-Plasmids waren, wodurch die These eines gemeinsamen Ursprungstammes der EHEC und aEPEC der Serogruppe O26 gefestigt wurde (26). Zudem ist sämtlichen Serovaren O26 (EHEC als auch aEPEC), deren Chromosom das *eae*-Gen beinhaltet, das *fliC*-Gen, welches für H11-Flagellin kodiert, ungeachtet dessen Expression, gemeinsam (74). Die Suche nach genetischen Differenzen zwischen *stx*-positiven *E. coli* O26:H11 Stämmen mittels Multilocus Sequenztypisierung (MLST) zeigte gut vergleichbare Ergebnisse, jedoch keine signifikanten genetischen Varianten innerhalb der einzelnen untersuchten *E. coli* O26:H11 Isolate. Auch diese Studie schlussfolgerte, dass *stx*-positive *E. coli* O26:H11 auf einen gemeinsamen Ursprungstamm zurückzuführen sind, unter der Voraussetzung durch das MLST eine repräsentative Anzahl an Genloci examiniert zu haben (27). Diese Ergebnisse ermöglichen eine Zuordnung der untersuchten *E. coli* O26:H11 in drei Kategorien: Entweder sind *eae*-positive, *stx*-negative und EHEC-Plasmid positive O26:H11 Serovare aEPEC (48) oder sie stellen Shiga Toxin-produzierende EHEC dar, deren Chromosom das *stx*-Gen verloren hat. Als dritte Möglichkeit sind diese O26:H11 Stämme Vorläufer eines EHEC O26:H11 Klons, der durch Transduktion ein *stx*-Gen und damit die Fähigkeit zur Shiga Toxin-Produktion erhält (75).

Diese Einteilung wurde 2003 auch von Anjum *et al.* aufgenommen (1). Durch das Verfahren des „comparative genomic indexing“ (CGI) wurde ein grundlegender Vergleich des Genoms der isolierten O26 Serotypen möglich. Als Ausgangsgenom, mit dem sämtliche getestete *E. coli* Genome verschiedener Serovare der Studie verglichen wurden, diente *E. coli* K-12. Mit

Hilfe des CGI konnte gezeigt werden, dass innerhalb der verschiedenen O-Serogruppen und dem K-12-Genom zu über 90% ein gemeinsamer Genpool vorliegt. Um als eine Spezies definiert werden zu können, scheint dieser gemeinsame Genpool die minimale Voraussetzung für diese Bakteriengruppe darzustellen. Sämtliche *E. coli* der Serogruppe O26 der Studie von Anjum *et al.* (1) produzierten Intimin β und wurden konventionell anhand ihrer Virulenzeigenschaften in EHEC, EPEC und atypische EPEC eingeteilt. Das durchgeführte CGI zeigte, dass die Stx-positiven und –negativen *E. coli* O26 zu 92,7% ein ähnliches Genom aufweisen und sich speziell in einer Genregion (5,2-kb groß) unterscheiden. Zusätzlich zu gemeinsamen Genregionen sowohl der EHEC als auch der aEPEC wurden deutlich variable Genregionen gefunden, deren Identifizierung in kommenden Studien die Fragen des Gentransfers und der daraus resultierenden Verwandtschaft der Serogruppen untereinander detaillierter klären könnte (1).

Eine umfassende Untersuchung von 102 *stx*-positiven bzw. *stx*-negativen *E. coli* O26:H11 auf ihre phänotypischen Eigenschaften als auch das Vorliegen von Virulenzgenen hin, zeigte abgesehen von dem *stx*-Gen, mehrheitlich identische und dauerhaft konservierte Chromosomenabschnitte der *E. coli* O26:H11 (6). Durch das CGI wurde neben der Multilocus Sequenztypisierung (27), der Multilocus Enzymelektrophorese (20, 72), dem Vergleich der „house-keeping genes“ (51) und der Virulenzgene (6, 26, 74) die Annahme eines gemeinsamen Ursprungsstammes der aEPEC und EHEC der Serogruppe O26:H11, und deren daraus resultierende nahe Verwandtschaft, untermauert. Bei der MLST zur Analyse bakterieller Populationsstrukturen werden üblicherweise sechs bis acht interne Fragmente (ca. 500 bp) so genannter 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.

Auch die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die These, dass der aEPEC O26:H11 der zweiten Stuhlprobe entweder ein Vorläufer des EHEC O26:H11 ist, dessen Chromosom durch Transduktion ein *stx*-Gen erhalten kann. Oder dieser Stamm O26:H11 ist ein EHEC, der sein Shiga Toxin-Gen verloren hat. Der Mechanismus des *stx*-Genverlusts aus dem Bakterienchromosom ist bislang noch ungeklärt. *Stx*-Gen enthaltende Bakteriophagen scheinen das entscheidende Element der Konversion der aEPEC in EHEC und umgekehrt zu sein. Schmidt *et al.* demonstrierten, dass eine *stx*₂ übertragende Phage, isoliert aus einem *E. coli* O157, fähig ist, andere *E. coli* inklusive EHEC und EPEC der Serogruppe O26 zu infizieren (57). Umgekehrt kann der Verlust einer *Stx*-kodierenden Phage in einem EHEC gleichzeitig zu dem Verlust des *stx*-Gens führen, mit resultierender Konversion in einen atypischen EPEC (61). Verschiedene Untersuchungen zur Stabilität des Phagengenoms im *E. coli* Chromosom zeigen, dass z. B. Antibiotika neben der erhöhten Shiga Toxin-Produktion des Bakteriums auch eine Exzision der Phage aus dem chromosomalen Bakteriengenom bewirken können (61).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein ausschließliches Zuordnen der Bakterienisolate erkrankter Patienten aufgrund der Serogruppe und der *Stx*-Produktion irreführend und nicht ausreichend sein kann. Die enge Verwandtschaft und die Transformation innerhalb weniger Tage von einem EHEC zu aEPEC (s. Stuhlproben eins und zwei dieser Studie) machen die Variabilität des Genoms dieser *E. coli* in Bezug auf den *stx*-Abschnitt deutlich. Diese Erkenntnisse erfordern die Erfassung zusätzlicher Virulenzmarker, um die Virulenz derartiger Stämme zu erkennen und die fortschreitende Entwicklung von neuen Pathogenen rechtzeitig zu entdecken. Patienten mit Durchfallssymptomatik, in deren Stuhlproben ein atypischer EPEC O26:H11-Isolat identifiziert wird, müssen in Zukunft eventuell ebenso auf das Entstehen eines hämolytisch-urämischen Syndroms hin überwacht werden, wie es bislang nur bei an EHEC erkrankten Patienten erforderlich war.

Obwohl die klinische Bedeutung von *E. coli* O26 Isolaten weltweit zunimmt (31), existiert bis heute kein eindeutiges Selektivmedium für diese *E. coli* Stämme. Die Korrelation zwischen dem Vorkommen des *ter*-Gens in den untersuchten *E. coli* Stämmen dieser Studie und der Fähigkeit auf Tellurit enthaltenden Medien zu wachsen, deutet darauf hin, dass das *ter*-Gen der Serogruppe O26:H11 genauso wie jenes der EHEC der Serogruppe O157:H7 für die Telluritresistenz kodiert (7). Die etablierte Methode sorbitolfermentierende *E. coli* O157:H7 auf CT-SMAC zu isolieren (44), führt dazu, dass Sorbitol nicht-fermentierende *E. coli* O26:H11 auf CT-SMAC leicht von der Serogruppe O157:H7 zu unterscheiden sind, aber gleichzeitig nicht von den Bakterien der normalen Darmflora. EHEC der Serogruppe O26 fermentieren im Gegensatz zu den Serovaren O111, O157 und non-STEC keine Rhamnose. Durch ihre Telluritresistenz wachsen sie auch auf CT-RMAC. Sämtliche untersuchten *E. coli* Isolate dieser Studie zeigten das für *E. coli* der Serogruppe O26:H11 typische, nicht Rhamnose fermentierende, telluritresistente Wachstum. Das im Agar enthaltene Tellurit unterdrückt die Entwicklung anderer gramnegativer Bakterienkolonien der normalen Darmflora inklusive *Pseudomonas aeruginosa*. Cefixim in einer Konzentration von 0,05mg/l inhibiert *Proteus spp.* ohne Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* der Serogruppe O26 (32). Diese Zusammenhänge werden in Tabelle 14 verdeutlicht.

Tabelle 14: Wachstum und Fermentation verschiedener *E. coli* Isolate bzw. fäkaler Bakterienstämme auf Nährmedien

| Nähr-medium | <i>E. coli</i> Isolate bzw. fäkale Bakterienstämme | | | | | |
|--------------------|--|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------------|
| | O26 | O157 | nonSTEC | Proteus spp. | Pseudomonas aer. | andere fäkale Bakterien |
| SMAC | positiv | negativ | positiv | - | - | positiv |
| RMAC | negativ | positiv | positiv | | | positiv |
| Tellurit | resistent | resistent | sensibel | resistent | sensibel | sensibel |
| Cefixim (0,05mg/l) | resistent | resistent | resistent | sensibel | resistent | resistent |

verändert nach Hiramatsu *et al.*, 2002,

positiv = Fermentation
negativ = keine Fermentation

Durch diese Eigenschaften wird aktuell der CT-RMAC als Selektivmedium für *E. coli* der Serogruppe O26 diskutiert (31, 32). Auch die Ergebnisse dieser Studie spiegeln die oben beschriebenen, phänotypischen Eigenschaften der EHEC und aEPEC O26:H11 als Grundlage für die Etablierung des Isolationsmediums wieder. Leider existieren in Deutschland und England Rhamnose nicht-fermentierende O157:H7 Serotypen, wodurch eine Trennung der Serogruppe O26:H11 von diesen nicht Rhamnose fermentierenden *E. coli* O157:H7 auf CT-RMAC nicht möglich ist (7). Eine prospektive Studie zur Möglichkeit des Routineeinsatzes des CT-RMAC als Isolationsmedium für *E. coli* O26 ist notwendig und wird zur Zeit am Institut für Hygiene der Universität Münster durchgeführt (6).

6 Literaturverzeichnis

1. **Anjum, M. F., Lucchini, S., Thompson, A., Hinton, J. C. D. and Woodward, M. J.** "Comparative genomic indexing reveals the phylogenomics of *Escherichia coli* pathogens." *Infect Immun*, 2003, 71(8): 4674-4683.
2. **Banatvala, N., Griffin, P. M., Greene, K. D., Barrett, T. J., Bibb, W. F., Green, J. H. and Wells, J. G.** "The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings." *J Infect Dis*, 2001, 183(7): 1063-1070.
3. **Bell, B. P., Griffin, P. M., Lozano, P., Christie, D. L., Kobayashi, J. M. and Tarr, P. I.** "Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections." *Pediatrics*, 1997, 100(1): E12.
4. **Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. and Schmidt, G.** "Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release." *J Clin Invest*, 1990, 85(6): 1746-1753.
5. **Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Minarikova, H., Jikova, E., Karmali, M. A., Laubova, J., Sikulova, J., Preston, M. A., Khakhria, R., Karch, H., Klazarova, H. and Nyc, O.** "Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk." *Epidemiol Infect*, 1997, 119(3): 299-305.
6. **Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Tarr, P. I., Sonntag, A. K. and Karch H.** "Molecular Profiling and Phenotype Analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: Secular and Geographic Consistency of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic Isolates." *J Clin Microbiol*, 2005a, 43(8): 4225-4228.
7. **Bielaszewska, M., Tarr, P. I., Karch, H., Zhang, W. L. and Mathys, W.** "Phenotypic and molecular analysis of tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and sorbitol-fermenting O157:NM clinical isolates." *J Clin Microbiol*, 2005b, 43(1): 452-454.
8. **Bitzan, M. M., Wang, Y., Lin, J. and Marsden, P. A.** "Verotoxin and ricin have novel effects on preproendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide synthase (ecNOS) expression and NO production in vascular endothelium." *J Clin Invest*, 1998, 101(2): 372-382.
9. **Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I. and Blanco, J.** "Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain." *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1351-1356.
10. **Blank, T., Lacher, D., Scaletsky, I., Zhong, H., Whittam, T., Donnenberg, M.** "Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 Strains from Brazil." *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(1): 113-115.
11. **Brandt, J. R., Fouser, L. S., Watkins, S. L., Zelikovic, I., Tarr, P. I., Nazar-Stewart, V. and Avner, E. D.** "*Escherichia coli* O 157:H7-associated

- hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers." *J Pediatr*, 1994, 125(4): 519-526.
12. **Caprioli, A., Tozzi, A. E., Rizzoni, G. and Karch, H.** "Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe." *Emerg Infect Dis*, 1997, 3(4): 578-579.
 13. **Cavaliere, S. J., Bohach, G. A. and Snyder, I. S.** "*Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity." *Microbiol Rev*, 1984, 48(4): 326-343.
 14. **Cebula, T. A., Payne, W. L. and Feng, P.** "Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR." *J Clin Microbiol*, 1995, 33(1): 248-250.
 15. **Cohen, M. L.** "Changing patterns of infectious disease." *Nature*, 2000, 406(6797): 762-767.
 16. **Donnenberg, M. S., Tacket, C. O., James, S. P., Losonsky, G., Nataro, J. P., Wasserman, S. S., Kaper, J. B. and Levine, M. M.** "Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection." *J Clin Invest*, 1993, 92(3): 1412-1417.
 17. **Donnenberg, M. S. and Whittam, T. S.** "Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *J Clin Invest*, 2001, 107(5): 539-548.
 18. **Dundas, S., Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K. and Hutchinson, S. J.** "The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients." *Clin Infect Dis*, 2001, 33(7): 923-931.
 19. **Eklund, M., Scheutz, F. and Siitonen, A.** "Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype." *J Clin Microbiol*, 2001, 39(8): 2829-2834.
 20. **Feng, P., Lampel, K.A., Karch, H., Whittam, T. S.** "Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7." *J. Infect. Dis*, 1998, 177: 1750-1753.
 21. **Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. and Karch, H.** "*Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms." *J Infect Dis*, 2002, 185(1): 74-84.
 22. **Friedrich, A. W., Borell, J., Bielaszewska, M., Fruth, A., Tschape, H. and Karch, H.** "Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease." *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6): 2448-2453.

23. **Fruth A., Prager R., Friedrich A., Kuczius T., Roggentin P., Karch H., Ammon A., Bockemühl J., Tschäpe H.** „EHEC infections in humans in the Federal Republic of Germany, 1998-2001. Prevalence and types of pathogens." *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 2002, 45: 715-721.
24. **Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H. M. and Zimmerhackl, L. B.** "Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study." *J Infect Dis*, 2002, 186(4): 493-500.
25. **Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B.** "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 225-260.
26. **Giammanco, A., Maggio, M., Giammanco, G., Morelli, R., Minelli, F., Scheutz, F. and Caprioli, A.** "Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea." *J Clin Microbiol*, 1996, 34(3): 689-694.
27. **Gilmour, M. W., Tyler, C., Munro, J., Chui, L., Wylie, J., Isaac-Renton, J., Horsman, G., Tracz, D. M., Andrysiak, A. and Lai-King N.** "Multilocus Sequence Typing of *Escherichia coli* O26:H11 Isolates carrying *stx* in Canada does not identify genetic diversity." *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 5319-5323.
28. **Goncalves, A. G., Campos, L. C., Gomes, T. A., Rodrigues, J., Sperandio, V., Whittam, T. S. and Trabulsi, L. R.** "Virulence properties and clonal structures of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes." *Infect Immun*, 1997, 65(6): 2034-2040.
29. **Gyles, C.** "*Escherichia coli* in domestic animals." *Wallingford, UK: CAB International*, 1994.
30. **Hancock, D. D., Besser, T. E., Kinsel, M. L., Tarr, P. I., Rice, D. H. and Paros, M. G.** "The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State." *Epidemiol Infect*, 1994, 113(2): 199-207.
31. **Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Saito, M., Yatsuyanagi, J., Uchir, M., Kobayashi, K., Tanaka, H., Horikawa, K., Mori, R., Miyazaki, Y.** "Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, development of its isolation media." *Kansenshogaku Zasshi*, 1999, 73(5): 407-413.
32. **Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M. and Miyazaki, Y.** "Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains." *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3): 922-925.
33. **Holme, R.** "Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event." *Water Sci Technol*, 2003, 47(3): 1-6.
34. **Jelacic, J. K., Damrow, T., Chen, G. S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., Carvalho, H. M., Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. D. and Tarr, P. I.** "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and

- clinical profiles." *J Infect Dis*, 2003, 188(5): 719-729.
35. **Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. and Kaper, J. B.** "A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(20): 7839-7843.
 36. **Kaplan, B. S.** "Shiga toxin-induced tubular injury in hemolytic uremic syndrome." *Kidney Int*, 1998, 54(2): 648-649.
 37. **Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M. and Schmidt, H.** "Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections." *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999, 34(3): 229-243.
 38. **Karch, H., Tarr, P. I. and Bielaszewska, M.** "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine." *Int J Med Microbiol*, 2005, 295(6-7): 405-418.
 39. **Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S. and Lior, H.** "The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. 1985." *J Infect Dis*, 2004, 189(3): 556-563.
 40. **Kaye, S. A., Louise, C. B., Boyd, B., Lingwood, C. A. and Obrig, T. G.** "Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro." *Infect Immun*, 1993, 61(9): 3886-3891.
 41. **Leung, P. H. M., Peiris, J. S. M., Ng, W. W. S., Robins-Browne, R. M., Bettelheim, K. A. and Yam, W. C.** "A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7549-7553.
 42. **Levine, M. M., Xu, J. G., Kaper, J. B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H. and Wachsmuth, K.** "A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome." *J Infect Dis*, 1987, 156(1): 175-182.
 43. **Machado, J., Grimont, F. and Grimont, P. A.** "Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene." *Res Microbiol*, 2000, 151(7): 535-546.
 44. **March, S. B. and Ratnam, S.** "Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis." *J Clin Microbiol*, 1986, 23(5): 869-872.
 45. **Matussek, A., Lauber, J., Bergau, A., Hansen, W., Rohde, M., Dittmar, K. E. J., Gunzer, M., Mengel, M., Gatzlaff, P., Hartmann, M., Buer, J. and Gunzer, F.** "Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cells." *Blood*, 2003, 102(4): 1323-1332.
 46. **McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. and Kaper, J. B.** "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(5): 1664-1668.

47. **Morigi, M., Galbusera, M., Binda, E., Imberti, B., Gastoldi, S., Remuzzi, A., Zoja, C. and Remuzzi, G.** "Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress." *Blood*, 2001, 98(6): 1828-1835.
48. **Nataro, J. P. and Kaper, J. B.** "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11(1): 142-201.
49. **O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A. A. and Keusch, G. T.** "Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, 180: 65-94.
50. **Proulx, F., Seidman, E. G. and Karpman, D.** "Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome." *Pediatr Res*, 2001, 50(2): 163-171.
51. **Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K. and Whittam, T. S.** "Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*." *Nature*, 2000, 406(6791): 64-67.
52. **Robert Koch-Institut, Berlin.** "Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*." *Ratgeber Infektionskrankheiten*, 2003, Folge 6.
53. **Rodrigues, J., Scaletsky, I. C., Campos, L. C., Gomes, T. A., Whittam, T. S. and Trabulsi, L. R.** "Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55." *Infect Immun*, 1996, 64(7): 2680-2686.
54. **Santiago, F. S., Atkins, D. G. and Khachigian, L. M.** "Vascular smooth muscle cell proliferation and regrowth after mechanical injury in vitro are Egr-1/NGFI-A-dependent." *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 897-905.
55. **Schmidt, H., Russmann, H., Schwarzkopf, A., Aleksic, S., Heesemann, J. and Karch, H.** "Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls." *Zentralbl Bakteriol*, 1994, 281(2): 201-213.
56. **Schmidt, H., Beutin, L. and Karch, H.** "Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933." *Infect Immun*, 1995, 63(3): 1055-1061.
57. **Schmidt, H., Bielaszewska, M., Karch, H.** "Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2 encoding bacteriophage ϕ 538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7." *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 3655-3661.
58. **Schroeder, C. M., Meng, J., Zhao, S., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, C., McDermott, P. F., Wagner, D. D., Walker, R. D. and White, D. G.** "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans." *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(12): 1409-1414.
59. **Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. and Heesemann, J.** "Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans." *Infect Immun*, 1998,

- 66(2): 480-485.
60. **Scotland, S. M., Smith, H. R., Cheasty, T., Said, B., Willshaw, G. A., Stokes, N. and Rowe, B.** "Use of gene probes and adhesion tests to characterise *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom." *J Med Microbiol*, 1996, 44(6): 438-443.
 61. **Shaikh, N. and Tarr, P. I.** "*Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications." *J Bacteriol*, 2003, 185(12): 3596-3605.
 62. **Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W. and Bhakdi, S.** "Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function." *Infect Immun*, 1990, 58(11): 3796-3801.
 63. **Tarr, P. I., Neill, M. A., Clausen, C. R., Watkins, S. L., Christie, D. L. and Hickman, R. O.** "*Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology." *J Infect Dis*, 1990, 162(2): 553-556.
 64. **Tarr, P. I.** "*Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection." *Clin Infect Dis*, 1995, 20(1): 1-8; quiz 9-10.
 65. **Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C. Jr, Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R. and Besser, T. E.** "Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure." *Infect Immun*, 2000, 68(3), pp. 1400-1407.
 66. **Tarr, P. I. and Neill, M. A.** "*Escherichia coli* O157:H7." *Gastroenterol Clin North Am*, 2001, 30(3): 735-751.
 67. **Tarr, P. I., Gordon, C. A. and Chandler, W. L.** "Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome." *Lancet*, 2005, 365(9464): 1073-1086.
 68. **Taylor, D. E., Rooker, M., Keelan, M., Ng, L. K., Martin, I., Perna, N. T., Burland, N. T. V. and Blattner, F. R.** "Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates." *J Bacteriol*, 2002, 184(17): 4690-4698.
 69. **Thorpe, C. M., Smith, W. E., Hurley, B. P. and Acheson, D. W.** "Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression." *Infect Immun*, 2001, 69(10): 6140-6147.
 70. **Tozzi, A. E., Caprioli, A., Minelli, F., Gianviti, A., De Petris, L., Edefonti, A., Montini, G., Ferretti, A., De Palo, T., Gaido, M. and Rizzoni, G.** "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000." *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(1): 106-108.
 71. **Trabulsi, L. R., Keller, R. and Tardelli Gomes, T. A.** "Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*." *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(5): 508-513.

72. **Whittam, T. S., Wolfe, M. L., Wachsmuth, I. K., Orskov, F., Orskov, I. and Wilson, R. A.** "Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea." *Infect Immun*, 1993, 61(5): 1619-1629.
73. **Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L. and Tarr, P. I.** "The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections." *N Engl J Med*, 2000, 342(26): 1930-1936.
74. **Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Bockemuhl, J., Schmidt, H., Scheutz, F. and Karch, H.** "Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex." *J Clin Microbiol*, 2000a, 38(8): 2989-2993.
75. **Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Liesegang, A., Tschape, H., Schmidt, H., Bitzan, M. and Karch, H.** "Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains." *J Clin Microbiol*, 2000b, 38(6): 2134-2140.
76. **Zhang, W. L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S. and Schmidt, H.** "Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains." *J Clin Microbiol*, 2002a, 40(12): 4486-4492.
77. **Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Kuczius, T. and Karch, H.** "Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans." *J Clin Microbiol*, 2002b, 40(4): 1441-1446.
78. **Zoja, C., Angioletti, S., Donadelli, R., Zanchi, C., Tomasoni, S., Binda, E., Imberti, B., te Loo, M., Monnens, L., Remuzzi, G. and Morigi, M.** "Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1." *Kidney Int*, 2002, 62(3): 846-856.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| % | Prozent |
| µl | Mikroliter |
| °C | Grad Celsius |
| Abb. | Abbildung |
| ADH | Arginindihydrolase |
| A/E Läsion | attaching and effacing lesion |
| AMY | Amygdalin |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ARA | L-Arabinose |
| <i>bfp</i> | bundle-forming-pili-Gen |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | Circa |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| CIT | Citrat |
| cm | Zentimeter |
| CT-SMAC | Sorbitolhaltiger McConkey-Agar mit Potassium-Tellurit und Cefixime |
| CT-RMAC | Rhamnose-haltiger McConkey-Agar mit Potassium-Tellurit und Cefixime |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotide |
| <i>eae</i> | <i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen |
| EAEC | enteroaggregative <i>E. coli</i> |
| EAF | EPEC adherence factor |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EHEC | enterohämorrhagische <i>E. coli</i> |
| <i>EhlyA</i> | EHEC-Hämolysin-Gen |
| EIEC | enteroinvasive <i>E. coli</i> |
| EPEC | enteropathogene <i>E. coli</i> |
| <i>et al.</i> | et aliter (und andere) |
| ETEC | enterotoxische <i>E. coli</i> |
| Gb3 | Globotriaosylceramid |
| G/C | Guanin/Cytosin |
| GEL | Gelatinase |
| GLU | D-Glucose |
| HC | hämorrhagische Kolitis |
| HPI | high pathogenicity island |
| HUS | hämolytisch-urämisches Syndrom |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ S | Schwefelwasserstoff |
| IND | Indol |

| | |
|-------------------------|--|
| INO | Inosit |
| KatP | Katalase-peroxidase |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilo Dalton |
| l | Liter |
| LDC | Lysindecaboxylase |
| LEE | locus of enterocyte effacement |
| MAN | D-Mannit |
| MEL | D-Melibiose |
| mg | Milligramm |
| MH | Müller-Hinton |
| min | Minuten |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | messenger Ribonucleinsäure |
| MLST | Multilocus Sequenztypisierung |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ODC | Ornithindecaboxylase |
| ONPG | β -Galaktosidase |
| OX | Oxidase |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| <i>per</i> | plasmid-encoded regulator-Gen |
| <i>Pseudomonas aer.</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| RHA | L-Rhamnose |
| rRNA | ribosomal Ribonucleinsäure |
| RMAC | Rhamnose-haltiger McConkey-Agar |
| s | siehe |
| sec | Sekunde |
| Saa | STEC autoagglutinating adhesin |
| SAC | D-Saccharose |
| SMAC | Sorbitol-haltiger McConkey-Agar |
| SOR | D-Sorbit |
| STEC | Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i> |
| Stx | Shiga Toxin |
| TBE | Trisborat-EDTA-Puffer |
| TDA | Tryptophandesaminase |
| <i>ter</i> | Tellurit F-Gen |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| u.a. | unter anderem |
| URE | Urease |
| u.s.w. | und so weiter |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VP | Acetoinbildung |
| w/v | weight/volume (Gewicht/Volumen) |
| z.B. | zum Beispiel |

7.2 Abbildungsverzeichnis

- **Abbildung 1:** Charakteristische EPEC-A/E-Läsion im Ileum (verändert nach Nataro und Kaper, 1998).
- **Abbildung 2:** API 20 E, Testergebnisse des Bakterienstamms 318/98 (Probe B2).
- **Abbildung 3:** Hemmhofbildung des Isolats B2 (318/98) im Agardiffusionstest mit folgenden Antibiotika: AK: Amikain, Mez: Mezlocilin, ATM: Aztreonam, RD: Rifampicin.
- **Abbildung 4:** Telluritresistentes Wachstum und Fermentation der Bakterienprobe F2 (257/98) auf CT-SMAC.
- **Abbildung 5:** Gelelektrophoretische Analyse des PCR-Produkts *fliC* und der anschließenden Restriktionsanalyse von neun untersuchten Patientenisolaten (Serotyp O26:H11).
- **Abbildung 6:** Gelelektrophoretische Analyse des PCR-Produkts *eae-β* der zehn untersuchten Patientenisolate (Serotyp O26:H11).
- **Abbildung 7:** Evolutionsmodell atypischer EPEC und EHEC der Serogruppe O26:H11.

7.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zuordnung verschiedener *E. coli* Serotypen zu typischen bzw. atypischen EPEC.
- Tabelle 2: Aufführung der untersuchten *E. coli* Isolate.
- Tabelle 3: Die verwendeten Kontrollstämme und deren Serogruppe.
- Tabelle 4: Bestandteile und Auswertungsrichtlinien des API 20 E Tests.
- Tabelle 5: Bewertung der Hemmhofgröße (mm) des Agardiffusionstests auf MH-Agar nach DIN 58959/14 1997-06 für gramnegative Stäbchen.
- Tabelle 6: Aufführung der in der PCR genutzten Referenzstämme.
- Tabelle 7: PCR-Primer und –Bedingungen.
- Tabelle 8: Ergebnisse der Testungen der *E. coli* O26:H11 Isolate mittels API 20 E Testsystem.
- Tabelle 9: Ergebnisse der Testungen der Kontrollstämme mittels API 20 E Testsystem.
- Tabelle 10: Resistenzbestimmung der *E. coli* O26:H11 Isolate mittels Agardiffusionstest.
- Tabelle 11: Ergebnisse der Untersuchungen der *E. coli* O26:H11 Isolate auf Hämolyse, Telluritresistenz und Sorbitol- bzw. Rhamnosefermentation.
- Tabelle 12: Fragmentgrößen und Schnittstellen des Enzyms *Hha I* in dem *fliC*-Gen (1464 bp) der untersuchten O26:H11 Isolate.
- Tabelle 13: Ergebnisse der PCR-Untersuchungen der *E. coli* O26:H11 Isolate auf das Vorhandensein der Genabschnitte *rfbO26*, *fliC*, *stx*, *eae*, *EhlyA*, und *ter*.
- Tabelle 14: Wachstum und Fermentation verschiedener *E. coli* Isolate bzw. fäkaler Bakterienstämme auf Nährmedien.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Andrea Geueke
geboren am 05. Juni 1979 in Lennestadt

Schulausbildung

1989 – 1998 Städt. Gymnasium Schmalleberg

1998 Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

1999 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Philipps –
Universität- Marburg

2001 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Westfälischen
Wilhelms-Universität–Münster

09/02 – 07/03 Studium der Humanmedizin an der Universität
Nantes / Frankreich in Rahmen eines
Erasmusstipendiums

11/2004 Beginn des Forschungsabschnitts dieser zur
Dissertation eingereichten Arbeit

Praktisches Jahr (PJ)

04/05- 08/05 Klinik für Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin des Universitätsklinikum Münster

08/05- 11/05 Chirurgie am Hopital Riviera, Site de Montreux,
Universität Lausanne / Schweiz

11/05- 03/06 Innere Medizin am ev. Krankenhaus, Bergisch
Gladbach, Lehrkrankenhaus der Universität Bonn

06/2006 Abschluss des Studiums, 3. Staatsexamen

Derzeitiger Tätigkeitsbereich

07/06- 03/07 Assistenzärztin in der Gemeinschaftspraxis für
Allgemeinmedizin/Sportmedizin und Pädiatrie,
Geueke/Seidel, Bad Fredeburg

seit 04/2007 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin
am Eduardus-Krankenhaus, Köln – Deutz

Fremdsprachen

Französisch, Englisch (fließend in Wort und Schrift)

Münster, 05.08.2007

9 Danksagung

An erster Stelle geht mein besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. Helge Karch für seine engagierte Unterstützung und die hervorragende Betreuung bei dieser Promotionsarbeit. Danke für die große Chance, selbstständiges, wissenschaftliches Arbeiten erlernt zu haben.

Ein großes Dankeschön geht an meine Betreuerin Dr. Anne-Katharina Sonntag, für die unbezahlbaren Ermunterungen, kritischen Fragen und wichtigen Antworten. Für die tatkräftige Hilfe und die vielen freundschaftlichen Gespräche zu allen Lebenslagen.

Des weiteren danke ich Dr. Wen Lan Zhang und Dr. Martina Bielaszewska für die vielen Hilfestellungen im Laboralltag und die dauerhafte Bereitschaft, auf meine Fragen eine Antwort zu finden. Auch dem Laborteam der Krankenhaushygiene danke ich für die freundliche, entspannte Atmosphäre.

Sämtliche Abbildungen dieser Arbeit und der 1,5fache Zeilenabstand sind Anne Vollmers gewidmet. Danke für all das Lachen und eine 24 Stunden rund um die Uhr geschaltete Computerhotline. Danke für eine wundervolle Freundschaft und unsere unzähligen gemeinsamen Kapitel, unabhängig von Dokortiteln.

Ich danke Visvakanth Sivanathan, weil er immer da war und ist, von Anfang an. Weil mein Abschluss ohne ihn nur halb so schön wäre.

Von ganzem Herzen danke ich Dir, Matthias. Für jeden einzelnen, gemeinsamen Tag. Vergangen, gegenwärtig und zukünftig.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner Familie, meinen Eltern Arnold und Dorothee, Arno, Maximilian, Theo Schulte und Sigrid. Durch Euch und Eure bedingungslose Unterstützung stehe ich heute hier. Durch Euch erhält meine Welt Farbe und Freude.

Danke, Andrea.

Für Paula Schulte. Du fehlst.