

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

**Plasmid kodierte Determinanten als  
molekularbiologische Marker bei Sorbitol  
fermentierenden EHEC O157:H<sup>-</sup>**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Kuhl, Kai Maarten**

aus Essen

2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. A.W. Friedrich

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. C. von Eiff

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

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

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A.W. Friedrich

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. C. von Eiff

## ZUSAMMENFASSUNG

Plasmid kodierte Determinanten als molekularbiologische Marker bei Sorbitol

fermentierenden EHEC O157:H<sup>-</sup>

Kuhl, Kai Maarten

Sorbitol fermentierende (SF) enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) des Serotyps O157:H<sup>-</sup> sind besonders in Deutschland als Auslöser von Diarrhoe und dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) von Bedeutung, wobei zahlreiche Virulenzfaktoren auf mobilen genetischen Elementen wie zum Beispiel Phagen oder Plasmiden kodiert sind. In dieser Arbeit wurde die Verbreitung der Plasmid kodierten Gene *sfpA*, *wabB*, *stcE*, *etpD*, *E-hlyA* und *traM* bei 41 SF O157:H<sup>-</sup> untersucht und mit dem Vorkommen bei 44 nicht Sorbitol fermentierenden (NSF) O157:H7/H<sup>-</sup> verglichen. Die Bakterienstämme stammten aus klinischem Material der Jahre 1988-2003 von Patienten mit unterschiedlichem klinischem Verlauf aus Deutschland und der Tschechischen Republik. Nur in 32 (78%) der 41 SF O157:H<sup>-</sup> konnten sämtliche Gene nachgewiesen werden. Acht (19,5%) Stämmen fehlten die Gene *wabB*, *stcE*, *etpD*, und *E-hlyA*; bei einem (2,5%) Stamm war keines der Gene nachweisbar. Die NSF O157:H7/H<sup>-</sup> zeigten mit dem Fehlen von *sfpA* und *traM* und Nachweis der übrigen Gene bei 41 (93%) der 44 Stämme ein einheitlicheres Bild. Die vorliegenden Daten zeigen, dass nicht nur die bisher postulierten Unterschiede zwischen den Plasmiden von SF O157:H<sup>-</sup> und NSF 157:H7/H<sup>-</sup> bestehen, sondern sich auch innerhalb des Serotyps SF O157:H<sup>-</sup> eine Variabilität findet. Dabei lassen sich die SF O157:H<sup>-</sup> anhand der Gendistribution Plasmid kodierter Determinanten in zwei Gruppen einteilen: Die Stämme der Gruppe 1 verfügen über alle untersuchten Gene, während bei Gruppe 2 Stämmen nur *sfpA* und *traM* vorliegen. Es lässt sich vermuten, dass die Gruppe 2 Stämme durch einen Verlust eines Teils des Virulenzplasmids aus den Gruppe 1 Stämmen hervorgegangen sind und so eine klonale Gruppe bilden.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2007

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> (EHEC).....</b> | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Epidemiologie und Übertragungswege.....</b>                  | <b>2</b>  |
| <b>1.3 Klinik und Therapie .....</b>                                | <b>3</b>  |
| <b>1.4 Pathogenitätsfaktoren .....</b>                              | <b>6</b>  |
| 1.4.1 Toxine.....   | 6         |
| 1.4.2 Adhäsionsfaktoren .....                                       | 7         |
| 1.4.3 Virulenzplasmid .....   | 7         |
| <b>1.5 Sorbitol fermentierende O157:H<sup>-</sup> .....</b>         | <b>8</b>  |
| <b>1.6 Diagnostik.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1.7 Zielsetzung der Arbeit.....</b>                              | <b>10</b> |
| <br>  |           |
| <b>2 MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>                              | <b>11</b> |
| <b>2.1 Materialien .....</b>  | <b>11</b> |
| 2.1.1 Laboreinrichtungen und Geräte .....                           | 11        |
| 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....                   | 12        |
| 2.1.3 Gebrauchslösungen.....  | 13        |
| 2.1.4 Software.....   | 13        |
| 2.1.5 Synthetische Oligonukleotide.....                             | 14        |
| 2.1.6 Nährmedien .....  | 14        |
| 2.1.7 Bakterienstämme .....   | 15        |
| <b>2.2 Methoden .....</b>   | <b>15</b> |
| 2.2.1 Bakterienanzucht .....  | 15        |
| 2.2.2 Amplifikation und Detektion.....                              | 15        |
| 2.2.2.1 DNA-Preparation.....  | 15        |
| 2.2.2.2 PCR.....  | 16        |
| 2.2.3 Sequenzierung der Amplifikationsprodukte.....                 | 17        |
| 2.2.3.1 DNA-Extraktion .....  | 17        |
| 2.2.3.2 Amplifikation und Produktaufreinigung.....                  | 18        |
| 2.2.3.3 Sequenzierung .....   | 18        |
| 2.2.3.4 Sequenzanalyse.....   | 19        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.4 Phänotypische Hämolyse.....   | 20        |
| 2.2.5 <i>fliC</i> RFLP.....   | 20        |
| <b>3 ERGEBNISSE.....</b>  | <b>21</b> |
| 3.1 Gendistribution von <i>sfpA</i> , <i>wabB</i> , <i>stcE</i> , <i>etpD</i> , <i>E-hlyA</i> und <i>traM</i> ..... | 21        |
| 3.2 Korrelation von Genprofil und Klinik.....   | 24        |
| 3.3 Sequenzanalyse repräsentativer Stämme.....  | 24        |
| 3.4 Hämolytischer Phänotyp.....   | 24        |
| 3.5 Sicherung der Serotypie ( <i>rfb</i> <sub>0157</sub> PCR und <i>fliC</i> PCR-RFLP) .....                        | 25        |
| <b>4 DISKUSSION .....</b>   | <b>26</b> |
| 4.1 Variabilität des Virulenzplasmids beim EHEC 1 Komplex .....   | 27        |
| 4.2 Phylogenie von SF O157:H <sup>-</sup> der Gruppe 1 und Gruppe 2.....  | 28        |
| 4.3 Klinische und diagnostische Wertigkeit der Plasmidgene.....   | 32        |
| 4.4 Plasmidverlust in vitro .....   | 33        |
| 4.5 Ausblick .....  | 34        |
| <b>5 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>8 DANKSAGUNG .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>9 LEBENS LAUF .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>ANHANG .....</b>   | <b>I</b>  |
| Tab. A Stammauswahl und Synopsis der Ergebnisse.....  | I         |
| Tab. B Sequenzierungsergebnisse und Vergleich mit EDL933 bzw. 3072/96 ..  | III       |

## 1 Einleitung

Durchfallserkrankungen sind eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in der heutigen Zeit und ein großer Anteil dieser wird durch darmpathogene *Escherichia coli* (*E. coli*) verursacht. In Entwicklungsländern sterben jährlich etwa 2,5 Millionen Menschen an den Folgen einer Durchfallserkrankung [54], wobei enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und besonders enterotoxische *E. coli* (ETEC), als Vertreter der darmpathogenen *E. coli* mit 630 Millionen Erkrankungen und knapp 800.000 Todesfälle pro Jahr für einen erheblichen Anteil verantwortlich sind [23]. Derzeit werden je nach Autor bis zu sieben obligat darmpathogene *E. coli* Gruppen unterschieden [21, 69]. Zusätzlich zu den drei eben erwähnten sind dies: enteroaggregative *E. coli* (EAEC oder EAaggEC), diffus-adhärente *E. coli* (DAEC), Cytolethal-distending-Toxin (CDT) produzierende *E. coli* und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Letztere sind besonders in Industriestaaten von Bedeutung, in denen sie nicht zuletzt durch zahlreiche Ausbrüche seit ihrer Erstbeschreibung 1982 [80] zunehmend isoliert werden. Aufgrund der durch EHEC ausgelösten besonders gravierenden Erkrankungen wie hämorrhagischer Colitis, hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) und daraus resultierenden lethalen Ausgängen sowie der Tatsache, dass derzeit noch keine kausale Therapie zur Verfügung steht, ist dieser Erreger von herausragender Bedeutung für die medizinische Forschung.

### 1.1 Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

EHEC sind als diejenigen *E. coli* definiert, die unter Bildung von Shiga-Toxin (siehe unten) zur Ausbildung einer hämorrhagischen Colitis und/oder eines HUS führen können und stellen damit eine Untergruppe der Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC) dar, die unabhängig vom klinischen Bild nur durch das Vorhandensein des Toxins definiert werden [99]. STEC können somit auch nicht humanpathogene Stämme darstellen. Die historisch bedingten Begriffe Vero-Toxin produzierende *E. coli* (VTEC) und Shiga-like-Toxin produzierende *E. coli* (SLTEC) sind synonym zu STEC zu verwenden [11]. EHEC und das durch sie verursachte HUS sind nach §§ 6 und 7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) seit 2001 in Deutschland meldepflichtig [4].

## ***1.2 Epidemiologie und Übertragungswege***

Die erste Identifizierung von EHEC als humanes Pathogen fand 1982 mit der Beschreibung des Serovars O157:H7 als Auslöser zweier Ausbrüche von hämorrhagischer Colitis in den USA statt [80, 106]. Seither sind zahlreiche weitere Serovare wie O26:H11/H, O103:H2, O111:H, O91:H14, O145:H28 und O157:H [30] als EHEC in Erscheinung getreten, wobei O157:H7 weltweit das wichtigste Serovar bleibt. Aufgrund der Mobilität vieler Virulenzeigenschaften durch horizontalen Gentransfer ist von einer stetigen Entstehung neuer virulenter Erregertypen und damit Ausweitung des Typenspektrums auszugehen [13]. Von zahlreichen Ausbrüchen weltweit [6, 19, 22, 55, 93, 113] war der in Osaka, Japan, 1996 mit über 12.000 Erkrankten der bisher größte [32].

Mit jährlich um die 1000 gemeldeten EHEC-Infektionen und etwa 100 HUS-Fällen ist die Inzidenz in Deutschland seit Einführung des IfSG 2001 recht stabil [82]. Die tatsächliche Häufigkeit wird nach Sentinel-Studien aber mit etwa 10.000 Infektionen jährlich weitaus höher eingeschätzt [77]. EHEC-Erkrankungen treten dabei gehäuft in den Sommermonaten auf und betreffen zu einem Großteil Kinder unter fünf Jahren [82]. Als natürliches Reservoir für EHEC gelten asymptomatische Wiederkäuer, insbesondere Rinder, Schafe und Ziegen, aus deren Kot sie häufig isoliert werden können [114]. Aber auch andere Tiere wie Pferde, Hunde, Vögel und Fliegen sind als Träger von EHEC identifiziert worden [63]. Derzeit gelten drei Übertragungswege als gesichert, wobei zwischen sporadischen (> 90%) und Ausbruch assoziierten Infektionen unterschieden werden muss. Kontaminierte Lebensmittel und Wasser sind als Vehikel bei einer Vielzahl von Ausbrüchen identifiziert worden [105] und stellen für Personen ab zehn Jahren den Hauptinfektionsweg bei sporadischen Infektionen dar [84]. Auch Kontaktinfektionen von Mensch zu Mensch, so zum Beispiel in Kindergärten und Altenheimen, und direkte Tierkontakte (berufsbedingt oder in Streichelzoos) sind im Rahmen von Ausbrüchen in Erscheinung getreten [74]. Die beiden letztgenannten Infektionswege stehen besonders bei sporadischen EHEC-Infektionen von Kindern unter drei Jahren im Vordergrund [84], welches in Anbetracht der außerordentlichen Gefährdung dieser Altersgruppe für Präventionsempfehlungen von Wichtigkeit ist. Alle diese Übertragungswege werden durch eine sehr niedrige Infektionsdosis von teilweise



unter 50 Keimen [102], die durch die hochgradige Säuretoleranz von EHEC-Stämmen (besonders des Serovars O157) [60] bedingt ist, ermöglicht.

### ***1.3 Klinik und Therapie***

Infektionen durch EHEC können asymptomatisch verlaufen oder durch ein weites klinisches Spektrum von wässrigen und blutigen Durchfällen über HUS bis hin zum Tod in Erscheinung treten.

Nach einer Inkubationszeit von etwa drei (1-8) Tagen treten bei etwa 90% der Patienten wässrige Durchfälle auf [34], die von starken kolikartigen Bauchschmerzen, kurzzeitigem Fieber, Übelkeit und Erbrechen begleitet werden können. Diese Begleitsymptome können auch schon vor dem Eintreten der Diarrhoe die Erkrankung ankündigen. Nach zwei bis drei Tagen können die Durchfälle zunehmend blutig erscheinen. Zu diesem Zeitpunkt, an dem in vielen Fällen erst ein Arzt konsultiert wird, ist ein vorher eventuell vorhandenes Fieber meist abgeklungen, so dass afibrile Patienten geradezu charakteristisch für EHEC-Infektionen sind. Die meisten Erkrankungen heilen nach einer Woche folgenlos aus. Als intestinale Komplikationen besonders im Falle einer hämorrhagischen Colitis können jedoch ein Ileus nach Darminvagination oder eine nekrotisierende Colitis und daraus resultierend eine operationspflichtige Darmgangrän auftreten. Bei Erwachsenen kann die Colitis chronisch persistieren und muss dann gegen eine Colitis ulcerosa abgegrenzt werden [45].

Die häufigste und schwerwiegendste extraintestinale Komplikation, die sich bei fünf bis zehn Prozent der manifest erkrankten Kinder nach etwa einer Krankheitswoche entwickelt, ist das HUS, welches durch die Trias hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutes Nierenversagen gekennzeichnet ist. Symptome wie Blässe, Inappetenz, Irritabilität oder Lethargie und eine beginnende Oligurie treten dabei recht plötzlich nach zunächst scheinbarer Erholung von der Durchfallserkrankung auf. Pathologische Laborparameter wie eine erhebliche Anämie mit LDH-Erhöhung, Haptoglobinverbrauch und Nachweis fragmentierter Erythrozyten im Blutausschuss, Thrombozytopenie und ansteigende Retentionsparameter (Harnstoff, Creatinin) führen letztendlich zur Diagnose [5, 34]. Auch inkomplette Verlaufsformen des HUS so zum

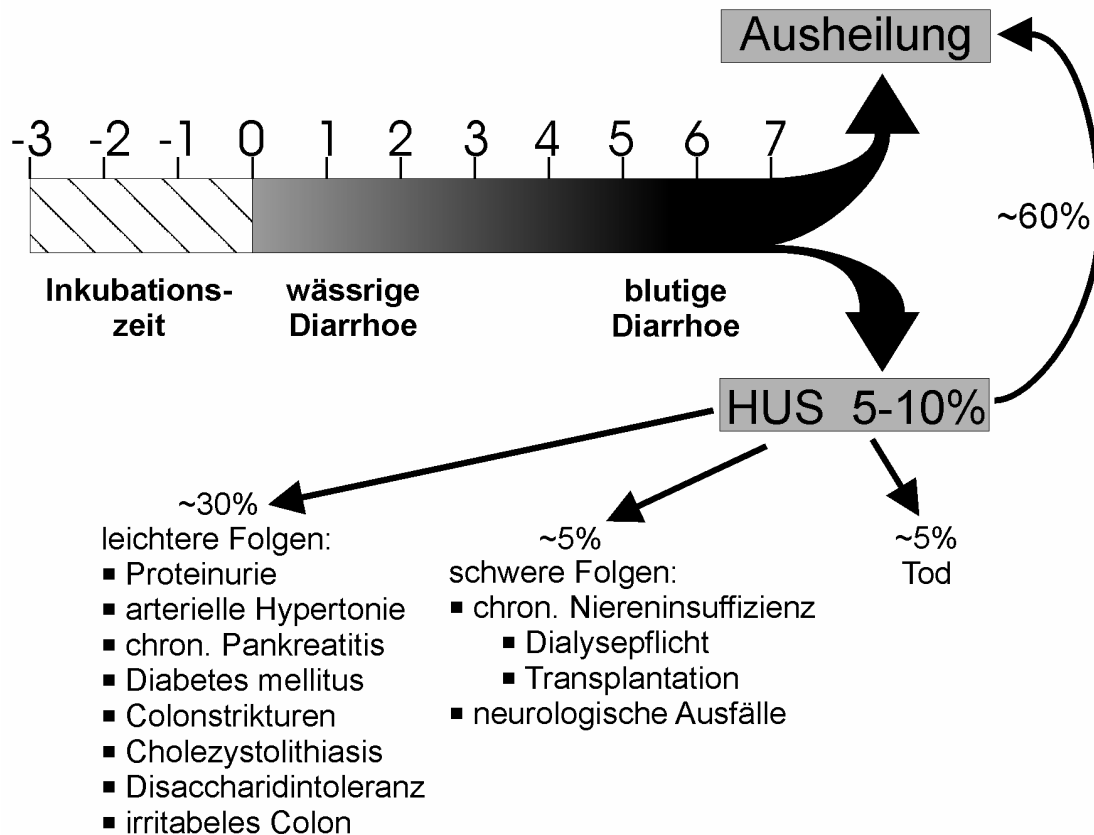
Beispiel mit isolierter Anämie sind beschrieben worden. Bei etwa einem Viertel der Patienten treten weitere zentralnervöse Komplikationen auf, die sich in Krämpfen, Koma, (Hemi-)Paresen oder gar einem akuten Hirnödem mit lethalem Ausgang manifestieren können. Hier zeigt sich die klinische Verwandtschaft des HUS zur thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), die jedoch eine völlig andere Pathogenese hat und bei der die zentralnervösen Manifestationen im Vordergrund stehen [79]. Weitere akute Komplikationen sind eine Pankreatitis oder auch kardiale und pulmonale Beteiligungen, die jedoch seltener auftreten.

Als Risikofaktoren für das Auftreten der beschriebenen Komplikationen insbesondere des HUS nach EHEC-Infektionen gelten die Symptome blutige Diarrhoe, persistierendes Fieber und Erbrechen, ein Alter unter 5 oder über 65 Jahre, die Gabe von Motilitätshemmern oder Antibiotika, eine Infektion durch Stx2 produzierende Stämme und eine starke Leukozytose [7, 20, 24, 28].

Die Mortalität in der Akutphase des HUS beträgt zwei bis sechs Prozent [5, 34]. In beinahe der Hälfte der überlebenden Patienten entwickeln sich jedoch Folgeschäden. Als intestinale Komplikationen treten dabei besonders eine Cholezystolithiasis durch die hohe Pigmentlast im Zuge der Hämolyse und Colonstrikturen auf. Seltener werden Glucose- oder Disaccharidintoleranzen, ein irritables Colon, chronische Pankreatitis oder Diabetes mellitus beschrieben. Entsprechend der Pathophysiologie des HUS stehen aber mit definitiven renalen und teils auch neurologischen Schäden die extraintestinalen Folgen im Vordergrund. So entwickelt sich eine terminale Niereninsuffizienz bei etwa 5% der Fälle und persistieren leichtere Schäden (Proteinurie, Hypertonie) bei einem Viertel der Patienten [33, 63, 98]. Eine Synopsis der durch EHEC verursachten Erkrankungen und Folgeschäden wird in Abb. 1.1 gegeben.

Da bisher noch keine spezifischen Therapieoptionen bestehen, beschränkt sich die Therapie von EHEC-Erkrankungen auf ein symptomatisches Management. Auch wenn von manchen Wissenschaftlern ein günstiger oder zumindest nicht negativer Effekt einer antibiotischen Therapie beschrieben wird [86], so wird von den meisten Klinikern und Institutionen so auch in Deutschland eine solche wegen des erhöhten Risikos, ein HUS zu entwickeln, abgelehnt [35, 66, 83, 98, 108, 109]. Auch motilitätshemmende Medikamente sollen aufgrund der prolongierten Bakterienkolonisation und -ausscheidung und des damit verbundenen erhöhten HUS-Risikos nicht eingesetzt

werden. Wegen der Gefahr einer Verminderung des renalen Blutflusses wird von dem Gebrauch nichtsteroidaler Antiphlogistika abgeraten [95].



**Abb. 1.1** Synopsis der Klinik von EHEC-Infektionen. Zeitskala in Tagen.

Als wichtigste supportive Maßnahme wird eine aggressive Flüssigkeitssubstitution angeraten. Dies ist besonders in Anbetracht des drohenden HUS essentiell, um eine Organperfusion besonders der Niere zu erhalten [97]. Eine im Verlauf entstehende Niereninsuffizienz macht bei etwa 60% der HUS-Patienten eine Dialyse notwendig. Eine transfusionspflichtige Anämie trat in 75%, eine zu behandelnde Thrombozytopenie in 16% der Patienten einer deutsch-österreichischen prospektiven Studie auf [34]. Die Effektivität einer besonders bei schweren neurologischen Komplikationen angewandten Plasmapherese ist noch nicht belegt.

Zahlreiche neue Therapieoptionen, die meist auf eine enterale Bindung und damit Elimination der Shiga-Toxine durch unterschiedliche Substanzen wie Gb<sub>3</sub>-Analoga oder spezifische Antikörper abzielen, werden derzeit erforscht. Jedoch konnte noch keines der Präparate in einer klinischen Studie einen günstigen Effekt zeigen [51]. Auch

hinsichtlich der Entwicklung einer Impfung werden zahlreiche Strategien verfolgt, jedoch steht in absehbarer Zeit keine solche zur Verfügung [110].

Aus diesen Einschränkungen hinsichtlich der Therapie von EHEC assoziierten Erkrankungen geht die Wichtigkeit der Prävention hervor. Hier sind besonders Hygienemaßnahmen in der Lebensmittelindustrie und in Streichelzoos oder Bauernhöfen, Richtlinien zum Umgang mit Patienten bzw. Ausscheidern als potentiellen Infektionsquellen und ein Ausbruchmanagement von Belang [83, 85].

### **1.4 Pathogenitätsfaktoren**

Die Pathogenität der EHEC wird durch zahlreiche Virulenzfaktoren bestimmt, die alle auf mobilen genetischen Elementen kodiert sind. Neben den Toxinen scheinen besonders Adhäsionsfaktoren und Plasmid kodierte Faktoren von Bedeutung zu sein.

#### **1.4.1 Toxine**

Der wichtigste Pathogenitätsfaktor der EHEC ist das entsprechend der ausgeprägten Homologie zum Toxin von *Shigella dysenterii* Typ 1 benannte Shiga-Toxin (Stx), wobei die beiden Hauptgruppen Stx1 (98% homolog zu Stx von *S. dysenterii*) und Stx2 (55% homolog zu Stx1) unterschieden werden. Die Strukturgene der Shiga-Toxine sind auf temperenten lamdoiden Phagen innerhalb des Bakterienchromosoms kodiert [73].

Das Holotoxin besteht aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf die Bindung vermittelnden B-Untereinheiten und gelangt möglicherweise an Leukozyten gebunden zu seinen Zielzellen [101]. Als Rezeptor fungiert dort in erster Linie das Globotriaosylceramid (Gb3) mit seinem terminalen Trisaccharid (gal $\alpha$ 1-4gal $\beta$ 1-4glu). Die A-Untereinheit terminiert mit ihrer N-Glykosidase-Aktivität die Proteinsynthese, indem sie einen spezifischen Adenylrest der ribosomalen 28S Untereinheit von 60S Ribosomen hydrolisiert und somit die Elongations-Faktor abhängige Bindung von aminoacyl-tRNA verhindert [72].

Zusätzlich zu Stx sind auch weitere Toxine so zum Beispiel das Phagen kodierte Cytholethal-distending-Toxin (CDT) [39] und kürzlich ein neues Plasmid gebundenes AB<sub>5</sub>-Toxin (Subtilase Cytotoxin bei O113) [75] in EHEC beschrieben worden, deren Funktion in der Pathogenese von Erkrankungen beim Menschen besonders in Anbetracht nicht Stx bildender EHEC [1, 91] noch weiterer Forschung bedarf. Auch das

hitze stabile Enterotoxin enteroaggregativer *E. coli* (EAST1) konnte in zahlreichen EHEC-Stämmen nachgewiesen werden und ist möglicherweise für die initiale wässrige Diarrhoe vieler Patienten verantwortlich [69]. Ein weiteres Plasmid kodiertes Toxin stellt das Poren bildende Zytotoxin EHEC-Hämolysin (E-Hly) dar, welches für den enterohämolytischen Phänotyp verantwortlich ist [88].

### 1.4.2 Adhäsionsfaktoren

Zahlreiche Gene von EHEC sind beschrieben, deren Produkte die Adhärenz an Darmepithel vermitteln können. Am besten charakterisiert und bei fast allen EHEC vorhanden ist die für die Ausbildung von „Attaching and Effacing“ (A/E) Läsionen verantwortliche Pathogenitätsinsel LEE (locus of enterocyt effacement). Das durch *eae* kodierte Protein Intimin ist dabei zusammen mit dem durch ein Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle eingeschleusten Rezeptor Tir (translocated intimin receptor) für eine feste Erregeradhärenz verantwortlich [62].

Als weitere potentielle Adhäsionsfaktoren wurden Iha (IrgA homologue adhesin) [94], Efa1 (EHEC factor for adherence) [40, 70], ToxB (toxin B) [100], Lpf (long polar fimbria) [103], OmpA (outer membrane protein A) [104] und Sfp (sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded) [14] beschrieben, deren tatsächliche Wertigkeit bei der Adhäsion jedoch noch unzureichend bekannt ist und die teils nur in bestimmten Serotypen zu finden sind.

### 1.4.3 Virulenzplasmid

Fast alle EHEC besitzen ein großes Plasmid, auf dem viele putative Virulenzfaktoren lokalisiert sind, die zum Teil an anderer Stelle schon erwähnt wurden (E-HlyA, ToxB, SfpA). Auf dem Plasmid pO157 von O157:H7 sind unter anderem eine den humanen Gerinnungsfaktor V spaltende Serinprotease (EspP) [17], eine bifunktionale Katalase/Peroxidase (KatP) [16], ein Typ II Sekretionssystem (Etp) [89] und eine den C1-Esterase-Inhibitor spaltende Metalloprotease (StcE) [58] charakterisiert worden. Die pathogene Wirkung des letztgenannten Proteins könnte durch die Rekrutierung von C1-Esterase-Inhibitor an Zelloberflächen entstehen, wodurch eine Komplement vermittelte Lyse der Zelle (Bakterium oder Wirtszelle) und eine inflammatorische Reaktion verhindert oder zumindest verzögert werden könnten [56]. Des Weiteren scheint StcE durch die Spaltung von Glycoproteinen an der Zelladhärenz beteiligt zu sein [36].

### 1.5 Sorbitol fermentierende O157:H<sup>-</sup>

Als epidemiologische Besonderheit werden in Deutschland als zweithäufigstes Serovar bei HUS-Patienten Sorbitol fermentierende (SF) O157:H<sup>-</sup> vorgefunden [28, 34], welche zum ersten Mal in einem Ausbruch 1988 in Bayern in Erscheinung getreten sind [50] und später für weitere Ausbrüche verantwortlich waren [3, 81]. War dieser Serotyp zunächst für einige Jahre auf Deutschland beschränkt, hat er sich mittlerweile nicht nur in angrenzende Staaten wie Tschechien und Österreich [1, 10] ausgebreitet, sondern wurde auch in Finnland [52], Schotland [92] und in Australien [8] jedoch bisher nicht in den USA [41, 53] isoliert.

**Tab. 1.1** Unterschiede zwischen SF EHEC O157:H<sup>-</sup> und NSF EHEC O157:H7/H<sup>-</sup> (modifiziert nach Karch et al. [44]).

|               |                        | SF O157:H <sup>-</sup>                  | NSF O157:H7/H <sup>-</sup>   |   |
|---------------|------------------------|---|--|---|
| Epidemiologie | regionale Distribution | eher kontinentales Europa               | weltweit   |   |
|               | saisonales Vorkommen   | Wintermonate                            | Sommermonate   |   |
|               | Reservoir              | nicht bekannt (wie O157:H7?)            | Rinder und andere Tiere  |   |
|               | Übertragungswege       | evtl. wie O157:H7 jedoch nicht bewiesen | Lebensmittel, Mensch zu Mensch, Tierkontakt                                  |   |
|               | Infektionsdosis        | nicht bekannt                           | < 50 Organismen  |   |
| Phänotyp      | SF*                    | +                                       | -  |   |
|               | GA**                   | +                                       | -  |   |
|               | E-Hly                  | -                                       | +  |   |
|               | Telluritresistenz      | -                                       | +  |   |
| Chromosom     | <i>stx</i>             | nur <i>stx</i> <sub>2</sub>             | <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub> |   |
|               | TAI***                 | -                                       | +  |   |
|               | Phagentyp              | 88, 23                                  | viele, jedoch nie 88 oder 23   |   |
| Genotyp       | Plasmid                | <i>katP</i>                             | -  | + |
|               |                        | <i>espP</i>                             | -  | + |
|               |                        | <i>toxB</i>                             | -  | + |
|               |                        | <i>sfp</i>                              | +  | - |
|               |                        | <i>E-hly</i>                            | +  | + |

\*Sorbitolfermentation

\*\*β-Glucuronidaseaktivität

\*\*\*tellurit resistance and adherence conferring island; unter anderem Iha (siehe 1.4.2)

Auf die Eigenständigkeit des SF O157:H<sup>-</sup> Klons wurde schon 1993 durch Karch et al. [46] nach PFGE-Analysen hingewiesen. Weitere Untersuchungen zur Evolution von *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> zeigten eine Divergenz von einem gemeinsamen Vorfahren zu *E. coli* K-12 vor etwa 4,5 Millionen Jahren und einen Erwerb von wesentlichen

Pathogenitätsfaktoren durch horizontalen Gentransfer und Rekombination [78]. Nach Multilocus-Enzym-Elektrophorese und Mutationsanalysen wird eine stufenweise Entstehung des O157 Komplexes aus einem EPEC O55:H7 Vorfahren vermutet, wobei der SF O157:H<sup>-</sup> Klon sich aus einer frühen Abspaltung vom O157:H7 Klon-Komplex entwickelt habe [25]. Epidemiologische, phänotypische und genotypische Unterschiede zu O157:H7 sind Folge der phylogenetischen Unterschiede bzw. spiegeln diese wider (Tab. 1.1) [44]. Das große Virulenzplasmid pSFO157 zum Beispiel ist um fast ein Drittel größer als pO157 und unterscheidet sich von diesem durch das Fehlen von *katP*, *espP* und *toxB* und demgegenüber dem Vorhandensein von *sfp* und großen Teilen einer F-Plasmid Transfer-Region [12].

### ***1.6 Diagnostik***

Der einzige Serotyp für den Selektivnährmedien (z.B. CT-SMAC) zum Screening zur Verfügung stehen ist O157:H7, dessen metabolische Besonderheiten der Unfähigkeit zur Sorbitolfermentation und der Verlust der  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität dabei ausgenutzt werden. Aufgrund des hohen Anteils anderer EHEC-Serotypen, die alle auf diese Weise nicht von kommensaler Flora zu unterscheiden sind, wird in Deutschland ein Stufenplan zur Diagnostik von EHEC empfohlen. Dieser sieht in der ersten Stufe zusätzlich zu Selektivnährmedien ein Screening auf Shiga-Toxin mit einem Enzymimmunoassay aus einer Anreicherungskultur vor. Ein positiver Befund gilt als Verdachtsdiagnose, die einer Bestätigung durch Isolierung und Charakterisierung des Erregers einschließlich eines erneuten Toxinnachweises (PCR) bedarf. In der dritten Stufe erfolgt eine Feintypisierung der Isolate zu epidemiologischen Zwecken im Nationalen Referenzlabor [27, 31]. Da die Ausscheidung von EHEC und damit die Nachweisbarkeit im Stuhl schnell abnimmt [96], ist besonders in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (z.B. HUS) ein selektives Anreicherungsverfahren mittels IMS (Immunmagnetischer Separation) oder auch ein serologischer Nachweis von LPS-Antikörpern von Bedeutung [48, 43].

### ***1.7 Zielsetzung der Arbeit***

Zusätzlich zum schon länger vollständig sequenzierten Virulenzplasmid von O157:H7, pO157, des Stammes EDL933 [18] wurde kürzlich die Sequenz des als pSFO157 designierten Plasmids des Sorbitol fermentierenden O157:H<sup>-</sup> Stammes 3072/96 veröffentlicht [12]. Zwischen diesen beiden Plasmiden und auch denen anderer Serotypen, besonders des EHEC 2 Komplexes, bestehen deutliche Unterschiede, wobei auch innerhalb von Serogruppen Varianzen gefunden wurden [14, 15]. Auf die Relevanz des Serotyps SF O157:H<sup>-</sup> speziell für Deutschland aber wegen seiner hohen Pathogenität und Ausbreitung auch darüber hinaus wurde schon hingewiesen. Über die mögliche Variabilität des Plasmids von SF O157:H<sup>-</sup> liegen bisher wenige Untersuchungen vor. So wurde nur von vereinzelt Varianten hinsichtlich der Gendistribution berichtet, bei denen die phylogenetische Beziehung zu den europäischen Stämmen jedoch noch nicht näher untersucht wurde [8].

Das Ziel dieser Arbeit ist es das Vorhandensein einer Auswahl an Plasmid kodierten Determinanten Sorbitol fermentierender O157:H<sup>-</sup> (*traM*, *sfpA*, *wabB*, *stcE*, *etpD* und *E-hlyA*) bei einer repräsentativen Gruppe klinischer Isolate von SF O157:H<sup>-</sup> und vergleichend NSF O157:H7/ H<sup>-</sup> zu überprüfen, um so zunächst die Gendistribution im untersuchten Kollektiv festzustellen. So sollen Aussagen zur Plasmidvariabilität gemacht werden. Durch potentielle Unterschiede in der Genausstattung könnten im Folgenden phylogentische Zusammenhänge beschrieben werden und Korrelationen zu klinischen Verläufen und damit die Relevanz der Gene in der Ausbildung eines HUS untersucht werden.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laboreinrichtungen und Geräte

|                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Arbeitshaube CleneCab              | Herolab, Wiesloch                  |
| Brutschrank „Function Line“        | Heraeus, Hamburg                   |
| Flachgelelektrophoreseeinheiten    |                                    |
| Comphor Midi und Comphor L Midi    | Biozym, Hessisch Oldendorf         |
| Geldokumentationsanlage GelDoc2000 | Bio-Rad-Laboratories, Segrate (I)  |
| Gießstand PhorCaster Midi          | Biozym, Hessisch Oldendorf         |
| Heizblöcke:                        |                                    |
| Blockthermostat BT 100             | Kleinfeld Labortechnik, Gehrden    |
| Heizblock Grant QBT                | Grant Instruments, Shepreth (GB)   |
| Kühl- und Gefrierschränke:         |                                    |
| verschiedene Modelle               | Kirsch, Offenburg                  |
| Magnetrührer mit Heizung:          |                                    |
| MR 3001                            | Heidolph, Schwabach                |
| IKAMAG RCT                         | IKA, Staufen                       |
| Magnetrührer MR 100                | Heidolph, Schwabach                |
| Pipetten: verschiedene Modelle     | Eppendorf, Hamburg                 |
| Power-Supply 2301 Macrodrive       | LKB Bromma, Stockholm (S)          |
| Sequencer ABI Prism 3100 Avant     |                                    |
| Genetic Analyzer 2001              | PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Sicherheitswerkbänke:              |                                    |
| Hera <i>safe</i> HS18 und HSP 18   | Heraeus, Hamburg                   |
| Thermocycler:                      |                                    |
| TGradient und T1Thermocycler       | Biometra GmbH, Göttingen           |
| Vakuumpzentrifuge                  |                                    |
| “Speedvac” Concentrator 5301       | Eppendorf, Hamburg                 |
| Vortexer:                          |                                    |
| REAX Top und REAX 2000             | Heidolph, Schwabach                |
| Vortex-Genie                       | Bendorf&Hobein AG, Zürich (CH)     |
| Zentrifugen:                       |                                    |
| Eppendorf Centrifuge 5810          |                                    |
| Eppendorf Centrifuge 5415D         |                                    |
| Mini Spin                          | Eppendorf, Hamburg                 |

Galaxy Mini Centrifuge

Merck eurolab, Leuven (NL)

**2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

10x NEBuffer 1

New England Biolabs, Frankfurt

10x PCR Puffer (100 mM HCl, pH 8,3/25°C, 500 mM KCl, autoklaviert)

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

96er-Mikrotiterplatten

Greiner, Frickenhausen

ABI Prism Big Dye™ Terminator  
Reaction Cycle Sequencing Kit

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Adhesive PCRFilm (sealing sheet)

ABgene House, Surrey (GB)

AmpliTaQ Gold DNA Polymerase (5 U/μl)

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Aqua ad injectabilia

Braun, Melsungen

Aqua bidestillata

Eigenherstellung

BMA SeaKem LE-Agarose

Biozym, Hessisch Oldendorf

Bromphenolblau

Merck, Darmstadt

dNTPs (10 mM) 1000 μl

Eppendorf, Hamburg

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

Sigma Aldrich, Deisenhofen

Einmalimpfeschlingen: 1 μl und 10 μl loops

Nunc, Roskilde (DN)

Ethidiumbromid 10 mg/ml

BioRad, Herkules (CA, USA)

Exonuklease I *E. coli* 20.000 U/ml

New England Biolabs, Frankfurt

Glycerin

Merck, Darmstadt

HiDi Formamid

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

HPLC Wasser Li Chrosoly

Merck, Darmstadt

InstaGene™ Matrix

BioRad, Herkules (CA, USA)

Magnesiumchlorid Pufferlösung (25 mM)

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Molekulargewichtsstandard

1-kbp-ladder und 100-bp-ladder (1 μg/μl)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

MultiScreen 96-well Filtration Plates

Millipore, Schwallbach

MultiScreen Column Loader 45 μl

Millipore, Schwallbach

Natriumchlorid 0,9%

Delta Pharm, Pfullingen

PCR Tubes 0,2 ml

Biozym, Hessisch Oldendorf

Pipettenspitzen, verschiedene  
Größen (teils gestopft)

Sarstedt, Nümbrecht

RsaI (10.000 U/ml)

New England Biolabs, Frankfurt

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Safe Lock Tubes (1,5 ml)                   | Eppendorf, Hamburg                    |
| Salzsäure 32%                              | Merck, Darmstadt                      |
| Sephadex G50 Superfine Kunstharz           | AmershamPharmaciaBiotech, Uppsala (S) |
| Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ $\mu$ l) | USB Amersham, Cleveland (OH, USA)     |
| Tris Ultra Qualität                        | Roth, Karlsruhe                       |
| Trisborat-EDTA-Puffer (TBE) 10x            | Roth, Karlsruhe                       |

### 2.1.3 Gebrauchslösungen

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| ABI Puffer                          | 400 $\mu$ l Stammlösung A (12,1 g Tris, 80 $\mu$ l HPLC Wasser, 32% HCl auf pH 9 (ca. 1,5 ml), ad 100 ml HPLC Wasser, autoklaviert)<br>10 $\mu$ l Stammlösung B (20,3 mg MgCl <sub>2</sub> in 100 ml HPLC Wasser)<br>590 $\mu$ l HPLC Wasser |
| Ethidiumbromidbad                   | 1 l Aqua bidestillata, 50 $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml)  |
| Probenpuffer<br>(Gelelektrophorese) | 125 mg Bromphenolblau, 17 ml Glycerin, 33 ml Aqua bidestillata   |
| TBE-Puffer 0,5x                     | 950 ml Aqua bidestillata, 50 ml 10x TBE-Puffer   |
| TE-Puffer                           | 121,44 mg Tris, 3,72 mg EDTA, 100 ml HPLC Wasser, 32% HCl auf pH 7,5 (ca. 80 $\mu$ l)  |

### 2.1.4 Software

OligonukleotidAuswahl:

|   |  |
|---|--|
| Primer Select Power Macintosh<br>3.04a und Edit Seq | DNA Star, Madison (WI, USA)  |
| Fast PCR © 1998-2004 v.3.3                          | R. Kalendar<br><a href="http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm">http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm</a> |

PCR-Dokumentation:

|                                       |                            |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Quantity One 1-D-Analysis<br>Software | BioRad, Herkules (CA, USA) |
|---------------------------------------|----------------------------|

Sequenzanalyse:

|                          |   |
|--------------------------|---|
| BLAST algorithm          | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a> |
| REBSites (REBASE tool)   | <a href="http://tools.neb.com/REBSites/">http://tools.neb.com/REBSites/</a>         |
| RidomTraceEdit-1.0       | Ridom GmbH, Würzburg, <a href="http://www.ridom.de">http://www.ridom.de</a>         |
| Sequence Navigator 1.0.1 | PE Applied Biosystems, Weiterstadt  |

Sequenzierung:

3100 Avant Data Collection  
Software

PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Statistik:

W.G. Miller

OpenStat3 Vers.3.5.7

<http://www.statpages.org/miller/openstat/OS3.html>

### 2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Ark Scientific GmbH, Darmstadt, (O157-F und O157-R) oder Sigma Genosys, Steinheim, (alle übrigen) bezogen (Tab. 2.1) und in TE-Puffer gelöst (Konzentrationen: 30 µmol/l). Zur Auswahl der Primer wird auf die angegebenen Referenzen und auf das Kapitel 2.2.2.2 verwiesen.

**Tab. 2.1** In dieser Arbeit verwendete Primer.

| Primer                               | Target                            | Sequenz   | Referenz   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| sfpA-U<br>sfpA-L                     | <i>sfpA</i>                       | 5'- AGC CAA GGC CAA GGG ATT ATT A -3'<br>5'- TTA GCA ACA GCA GTG AAG TCT C -3'  | [14]   |
| hlyA1<br>hlyA4                       | E- <i>hlyA</i>                    | 5'- GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G -3'<br>5'- TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A -3'  | [88]   |
| D1<br>D13R                           | <i>etpD</i>                       | 5'- CGT CAG GAG GAT GTT CAG -3'<br>5'- CGA CTG CAC CTG TTC CTG ATT A -3'        | [89]   |
| rfbU-fwd<br>rfbU-rev                 | <i>wabB</i><br>früher <i>rfbU</i> | 5'- AGC CTT CAC CTT CCT TCC -3'<br>5'- CTG TTG CAT TTC CCC TTA G -3'            | Prof. Schmidt,<br>Hohenheim (pers.<br>Korrespondenz) |
| traM-fwd<br>traM-rev                 | <i>traM</i>                       | 5'- GTT GCT TGA GTT AGG ATT GC -3'<br>5'- ACA TGA GGG CTA AGA GAC TC -3'        | Prof. Schmidt,<br>Hohenheim (pers.<br>Korrespondenz) |
| stcE-fwd1<br>stcE-rev1               | <i>stcE</i>                       | 5'- TCA GTG ATG CCA GCG GGA GTT -3'<br>5'- CCC GGG GAG TGG TCA ACA TC -3'       | diese Arbeit*  |
| O157-F<br>O157-R                     | <i>rfb<sub>O157</sub></i>         | 5'- AAC GGT TGC TCT TCA TTT AG -3'<br>5'- GAG ACC ATC CAA TAA GTG TG -3'        | [68]   |
| F- <i>fliC</i> 1<br>R- <i>fliC</i> 2 | <i>fliC</i>                       | 5'- ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACC CAA C -3'<br>5'- CTA ACC CTG CAG CAG AGA CA -3' | [26]   |

\* Primer entsprechend der Plasmidsequenz von pO157 (Acc. No. AF074613) [18] ausgewählt.

### 2.1.6 Nährmedien

Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) Difco laboratories, Detroit, MI, USA

Nähragar (Stich)

Eigenherstellung:

Nähr-Broth Mast DM 180 (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld), 15 g Sobigel Agar Mast RM 11 (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld), 1 l Aqua destillata

|                      |                                   |
|----------------------|-----------------------------------|
|                      | Röhrchen zu 2 ml                  |
| Columbia-Blutagar    | heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim |
| Enterohämolysin-Agar | SIFIN, Berlin                     |

### **2.1.7 Bakterienstämme**

Die Bakterienstämme wurden der Stammsammlung von Herrn Prof. Dr. Karch, Institut für Hygiene, Münster, entnommen. Es wurden 44 nicht Sorbitol fermentierende *Escherichia coli* O157:H7/H<sup>-</sup> und 41 Sorbitol fermentierende *E. coli* O157:H<sup>-</sup> Stämme aus den Jahren 1988 bis 2003 ausgewählt, die weitestgehend aus klinischem Material von Patienten im Rahmen der Routinediagnostik stammten. Dabei wurde auf eine Diversität der Merkmale Jahr der Isolation, Erkrankung und *stx*-Genotyp geachtet. Eine Tabelle der ausgewählten Stämme mit den besagten Merkmalen und Ergebnissen dieser Arbeit findet sich im Anhang (Tab. A).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Bakterienanzucht**

Die *Escherichia coli* Stämme wurden auf Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) kultiviert, wobei etwa alle zehn Tage durch Überimpfen neue Kulturen angelegt wurden. Diese wurden für 24 h bei 36°C bebrütet und dann bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Stämme auf Nähragar (Stich) überimpft, für 24 h bei 36°C bebrütet und schließlich bei 4°C gelagert.

### **2.2.2 Amplifikation und Detektion**

#### **2.2.2.1 DNA-Preparation**

Ein bis zwei Bakterienkolonien wurden in 50 µl 0,9% Natriumchlorid suspendiert und für 10 min bei 100°C im Blockthermostat inkubiert. 5 µl dieser Suspension wurden für den PCR-Ansatz verwendet.

### 2.2.2.2 PCR

Zur Amplifikation der jeweiligen Genabschnitte der bakteriellen DNA diente die Polymerasekettenreaktion (PCR). Für eine ausführliche Darstellung dieser wird auf weiterführende Literatur verwiesen [67]. Entsprechend der Primerlängen und -zusammensetzungen sowie der erwarteten Produktgrößen wurden die in Tab. 2.2 aufgeführten PCR-Bedingungen eingesetzt. Für die PCR wurde jeweils ein Reaktionsansatz bestehend aus 5 µl DNA-Suspension, 34 µl Aqua ad injectabilia, 5 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTPs (10 µM), 0,3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und je 1 µl Primer (30 µM) verwendet. Der *Escherichia coli* Stamm 3072/96, klinisches Isolat aus Deutschland [12], diente als Positivkontrolle für die Gene *sfpA* und *traM*, der Stamm EDL933, der 1982 in den USA aus Hamburgern isoliert wurde [71], für die übrigen Gene. Als Negativkontrolle für alle Genloci wurde der nicht pathogene Laborstamm *E. coli* C600 eingesetzt.

**Tab. 2.2** In dieser Arbeit verwendete PCR-Bedingungen.

| Primer                 | PCR-Bedingungen* |            |             | Produktlänge (bp) | Referenz   |
|------------------------|------------------|------------|-------------|-------------------|--|
|                        | Denaturierung    | Annealing  | Elongation  |                   |  |
| sfpA-U<br>sfpA-L       | 94°C, 30 s       | 59°C, 60 s | 72°C, 60 s  | 440               | [14]   |
| hlyA1<br>hlyA4         | 94°C, 30 s       | 57°C, 60 s | 72°C, 90 s  | 1551              | [88]   |
| D1<br>D13R             | 94°C, 30 s       | 56°C, 60 s | 72°C, 70 s  | 1062              | [89]   |
| rfbU-fwd<br>rfbU-rev   | 94°C, 30 s       | 51°C, 60 s | 72°C, 60 s  | 917               | Prof. Schmidt,<br>Hohenheim (pers.<br>Korrespondenz) |
| traM-fwd<br>traM-rev   | 94°C, 30 s       | 53°C, 60 s | 72°C, 30 s  | 159               | Prof. Schmidt,<br>Hohenheim (pers.<br>Korrespondenz) |
| stcE-fwd1<br>stcE-rev1 | 94°C, 30 s       | 60°C, 60 s | 72°C, 30 s  | 450               | diese Arbeit   |
| O157-F<br>O157-R       | 94°C, 30 s       | 57°C, 60 s | 72°C, 90 s  | 678               | [68]   |
| F-fliC1<br>R-fliC2     | 94°C, 30s        | 60°C, 60 s | 72°C, 120 s | 1758              | [26]   |

\*Initial 5 min bei 94°C, dann 30 (F-fliC1/R-fliC2: 35) Zyklen, finale Elongation für 5 min 72°C

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, durch Ethidiumbromid färbend sichtbar gemacht und anschließend mittels Computer dokumentiert.

Die Primer zur Amplifikation der Gene *sfpA*, *E-hlyA*, *etpD*, *rfb<sub>O157</sub>* und *fliC* wurden gemäß der in Tab. 2.2 genannten Referenzen ausgewählt. Die Oligonukleotidsequenzen *rfbU-fwd*, *rfbU-rev*, *traM-fwd* und *traM-rev* wurden freundlicherweise durch Herrn Prof. Schmidt, Hohenheim, (persönliche Korrespondenz) zur Verfügung gestellt. Mit *stcE-fwd1* und *stcE-rev1* wurde ein neues Primerpaar anhand der Plasmidsequenz *pO157* (Acc. No. AF074613) [18] ausgewählt, wobei die optimale Annealing Temperatur der zur Auswahl eingesetzten Computer Software entnommen wurde (Primer Select Power Macintosh 3.04a und Edit Seq).

### 2.2.3 Sequenzierung der Amplifikationsprodukte

Um die Spezifität der PCR mit den jeweiligen Primern zu belegen und die Stabilität der Gensequenzen zu ermitteln wurden bei sechs Bakterienstämmen die Gene ansequenziert und anschließend mit der Sequenz des jeweiligen Referenzstammes (EDL933 für *E-hlyA*, *etpD*, *wabB* und *stcE*; 3072/96 für *sfpA* und *traM*) auf Homologie hin verglichen. Zur Auswahl dieser sechs Stämme wurden die nicht Sorbitol fermentierenden und Sorbitol fermentierenden Stämme der Stammauswahl jeweils nach Jahrgängen in drei Pools klassifiziert (Pool A bis 1994, Pool B 1995 - 2000, Pool C 2001 - 2003), wobei die Stämme mit Genausfällen (siehe Tab. A im Anhang) eliminiert wurden. Aus jedem Pool wurde dann zufällig ein Stamm für die Sequenzierung ausgewählt, so dass zur Amplifikation und Sequenzierung die DNA-Extrakte folgender Stämme verwendet wurden: 93-36/89, 4391/96, 0144/03, Wü4991/92, 4180/97 und 0023/03.

#### 2.2.3.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde mit Hilfe der InstaGene<sup>TM</sup> Matrix extrahiert. Es wurden drei Bakterienkolonien von für 24 h bei 36°C inkubierten SMAC-Platten in 500 µl HPLC Wasser suspendiert und für eine Minute bei 12000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl InstaGene<sup>TM</sup> Matrix gelöst, für 20 min bei 56°C und dann für 8 min bei 100°C inkubiert, bevor eine dreiminütige Zentrifugation bei 12000 U/min folgte. Der

aus gelöster DNA bestehende Überstand (etwa 80µl) sowie eine 1:10 und 1:100 Verdünnung (TE-Puffer) von diesem wurden bei -20°C gelagert und konnten für die PCR verwendet werden.

### **2.2.3.2 Amplifikation und Produktaufreinigung**

Die Amplifikation der Gene aus der extrahierten DNA wurde wie in 2.2.2.2 beschrieben durchgeführt, wobei statt Aqua ad injectabilia HPLC Wasser eingesetzt wurde, um eine Kontamination mit Farbstoffen auszuschließen, und jeweils nur 10 pmol Primer verwendet wurden, um die Amplifikatmenge und den Primerüberschuss zu limitieren. Entsprechend der Produktmenge wurden die 1:10 oder 1:100 Verdünnungen der DNA Extrakte eingesetzt, um die Effizienz der nachfolgenden Aufreinigung zu erhöhen.

Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit Hilfe zweier hydrolytischer Enzyme, Exonuclease I (EXO I) und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), aufgereinigt, um überschüssige dNTPs und einzelsträngige Oligonukleotide zu degradieren, die mit der anschließenden Sequenzierung hätten interferieren können. Hierzu wurden 5 µl des PCR-Produkts mit jeweils 1 µl der beiden Enzyme (1 U/µl) versetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Enzyme für 15 min bei 80°C inaktiviert.

### **2.2.3.3 Sequenzierung**

Die Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger [87] durchgeführt. Mit dem ABI Prism Big Dye™ Terminator Reaction Cycle Sequencing Ready Reaction Mix kamen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs im Rahmen einer PCR-Sequenzierung (cycle sequencing) zum Einsatz, wobei getrennte Ansätze für forward- und reverse-Primer erstellt wurden. Ein Reaktionsansatz bestand aus 2 µl aufgereinigtem PCR-Produkt, 1 µl Primer (10 µM), 4,7 µl HPLC Wasser, 1,8 µl 5x ABI-Sequenzierungspuffer und 0,5 µl Big Dye™ Premix (Taq-Polymerase, dNTPs und Farbstoff markierte ddNTPs). Für die Genloci wurden die in Tab. 2.3 genannten Cycloer-Programme verwendet.

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wurde zur abschließenden Aufreinigung über Kunstharzsäulen geleitet. Hierzu wurden 45 µl Sephadex G 50 Superfine Pulver mit 300 µl HPLC Wasser in die Kavität einer MultiScreen HV Platte gegeben, für drei Stunden



bei Raumtemperatur quellen gelassen und das restliche Wasser abzentrifugiert (5 min, 2300 U/min). Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit 150 µl HPLC Wasser und anschließender Zentrifugation (5 min, 2300 U/min) wurden 10 µl des Sequenzierungs-PCR-Produkts auf die Säule aufgetragen und mittels abermaliger Zentrifugation (5 min, 2300 U/min) in eine Mikrotiterplatte eluiert. Diese aufgereinigte DNA wurde in einer Vakuumzentrifuge für 20 min bei 45°C getrocknet, in 20 µl Formamid gelöst und zur automatischen Sequenzierung in eine entsprechende Platte des Herstellers überführt.

**Tab. 2.3** Cycler-Programme für die Sequenzierung.

| Genlocus      | Zyklus (25x)  |           |             |
|---------------|---------------|-----------|-------------|
|               | Denaturierung | Annealing | Elongation  |
| <i>sfpA</i>   | 96°C, 10 s    | 59°C, 5 s | 60°C, 4 min |
| <i>E-hlyA</i> | 96°C, 10 s    | 57°C, 5 s | 60°C, 4 min |
| <i>etpD</i>   | 96°C, 10 s    | 56°C, 5 s | 60°C, 4 min |
| <i>wabB</i>   | 96°C, 10 s    | 51°C, 5 s | 60°C, 4 min |
| <i>traM</i>   | 96°C, 10 s    | 53°C, 5 s | 60°C, 4 min |
| <i>stcE</i>   | 96°C, 10 s    | 60°C, 5 s | 60°C, 4 min |

#### 2.2.3.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzen der Loci *etpD*, *E-hlyA* und *wabB* wurden mit RidomTraceEdit-1.0 analysiert und durch Fast PCR © 1998-2004 v.3.3 in ein einheitliches Format überführt, so dass die im Anhang (Tab. B) angegebenen Sequenzen dem Plus-Strang entsprechen. Soweit die Länge der sequenzierten Bereiche dies zuließ, wurden diese aneinander ausgerichtet (Fast PCR), um eine durchgehende Sequenz darstellen zu können. Die Länge der amplifizierten Bereiche der übrigen drei Loci (*stcE*, *sfpA* und *traM*) machte ein nahezu vollständiges Alignment möglich, so dass diese Sequenzen mit der Sequence Navigator 1.0.1 Software analysiert wurden.

Die so erhaltenen Sequenzen wurden auf Homologie hin mit den publizierten Plasmidsequenzen der EHEC Stämme EDL933 (Acc. No. AF074613) für *etpD*, *E-hlyA*,

*wabB* und *stcE* bzw. 3072/96 (Acc. No. AF401292) für die Gene *sfpA* und *traM* mittels des BLAST Algorithmus [2] verglichen.

#### **2.2.4 Phänotypische Hämolyse**

Zur Identifizierung des hämolytischen Phänotyps wurden sämtliche SF O157:H<sup>-</sup> sowie als Referenz der Stamm EDL933 auf Columbia-Blutagar und Enterohämolysin-Agar überimpft, für 24 h bei 36°C bebrütet und anschließend beurteilt.

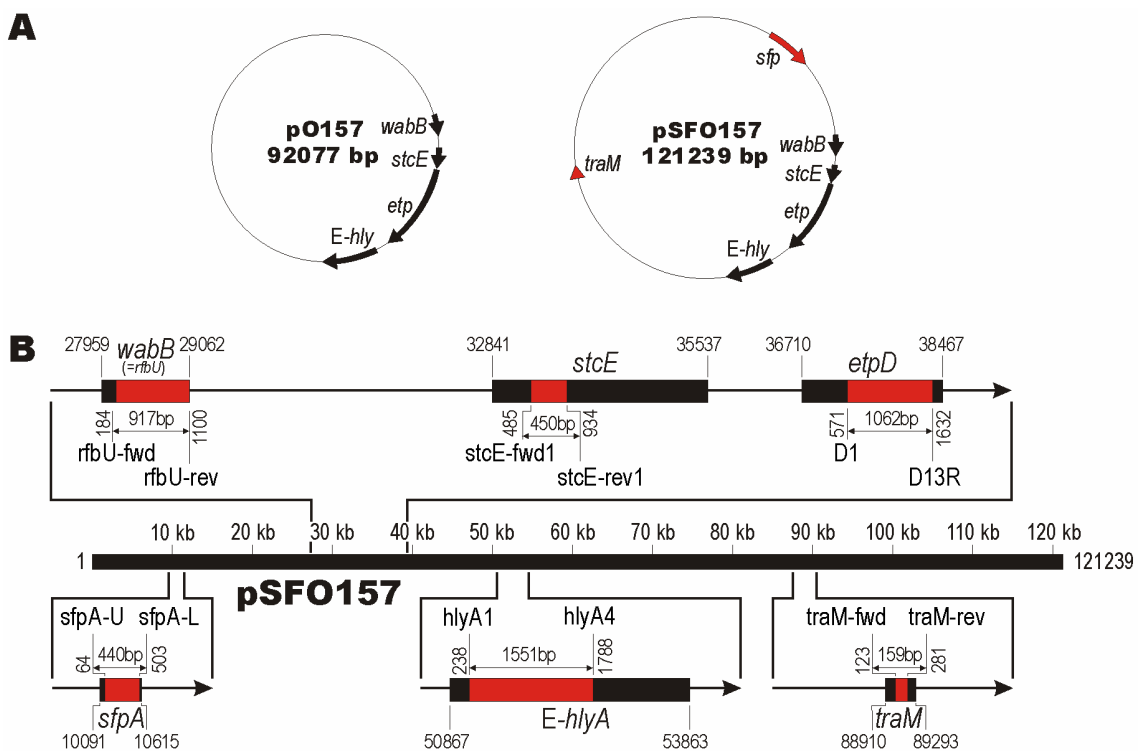
#### **2.2.5 *fliC* RFLP**

Bei allen neun SF O157:H<sup>-</sup> mit unvollständigem Genprofil wurde das *fliC* Gen wie in 2.2.2.2 beschrieben amplifiziert. Die *fliC* RFLP-Untersuchung wurde gemäß Fields et al. [26] aber mit folgenden Änderungen durchgeführt. 15 µl des PCR-Produkts wurden mit 0,5 µl RsaI (10.000 U/ml), 2 µl 10x NEBuffer 1 und 2,5 µl HPLC Wasser für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Restriktionsfragmente wurden auf 3% Agarosegel aufgetrennt, durch Ethidiumbromid färberisch sichtbar gemacht und anschließend mittels Computer dokumentiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gendistribution von *sfpA*, *wabB*, *stcE*, *etpD*, *E-hlyA* und *traM*

Um der Prävalenz der Gene *sfpA*, *wabB*, *stcE*, *etpD*, *E-hlyA* und *traM* bei NSF O157:H7/H<sup>-</sup> und SF O157:H<sup>-</sup> nachzugehen, wurden für die Loci *wabB*, *stcE* und *traM* jeweils spezifische Primerpaare für eine PCR designed; für die übrigen Genloci wurden etablierte PCR-Protokolle verwendet (siehe Tab. 2.1). Die Lokalisation der Gene und amplifizierten Bereiche auf den Plasmiden der Referenzstämme EDL933 (pO157) und 3072/96 (pSFO157) ist in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1** Lokalisation der untersuchten Gene bzw. Gencluster auf den Plasmiden pSFO157 und pO157. A) Rot dargestellt sind pSFO157 spezifische Gene, schwarze Pfeile entsprechen Genen, die beide Plasmide tragen. B) pSFO157 (Acc. No. 401292): Rot sind die durch die jeweilige PCR amplifizierten Bereiche dargestellt. Vertikal orientierte Zahlen geben die Angriffspunkte der entsprechenden Primer innerhalb des Gens an. Über den Doppelpfeilen ist die Produktlänge angegeben.

Der NSF O157:H7 Referenzstamm EDL933 war erwartungsgemäß nur PCR-positiv für die Gene *wabB*, *stcE*, *etpD*, und *E-hlyA*, während im SF O157:H<sup>-</sup> Referenzstamm 3072/96 alle untersuchten Gene mittels PCR nachgewiesen werden konnten. Der *E. coli* K-12 Laborstamm C600 wurde durch das Fehlen aller Gene als Negativkontrolle bestätigt.

41 (93%) der 44 untersuchten NSF O157:H7/H<sup>-</sup> zeigten mit dem Fehlen von *sfpA* und *traM* ein dem EDL933 identisches Genprofil (Tab. 3.1). Nur in drei Stämmen konnten ein oder mehr für pO157 typische Gene mittels PCR nicht nachgewiesen werden. Der Stamm 6702/94 war negativ für das *etpD* Gen, während in den Stämmen H671/89 und 4660/95 nur das E-*hlyA* Fragment amplifiziert werden konnte, die übrigen Gene jedoch nicht nachweisbar waren.

**Tab. 3.1** Genmuster der untersuchten SF O157:H<sup>-</sup> und NSF O157:H7/H<sup>-</sup>.

| Serotyp                    | <i>traM</i> | <i>sfpA</i> | <i>wabB</i> | <i>stcE</i> | <i>etpD</i> | E- <i>hlyA</i> | Anzahl | Anteil des Serotyps |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|--------|---------------------|
|                            | -           | -           | +           | +           | +           | +              | 41     | 93,2%               |
| NSF O157:H7/H <sup>-</sup> | -           | -           | -           | -           | -           | +              | 2      | 4,5%                |
|                            | -           | -           | +           | +           | -           | +              | 1      | 2,3%                |
| -----                      |             |             |             |             |             |                |        |                     |
|                            | +           | +           | +           | +           | +           | +              | 32     | 78%*                |
| SF O157:H <sup>-</sup>     | +           | +           | -           | -           | -           | -              | 8      | 19,5%**             |
|                            | -           | -           | -           | -           | -           | -              | 1      | 2,5%                |

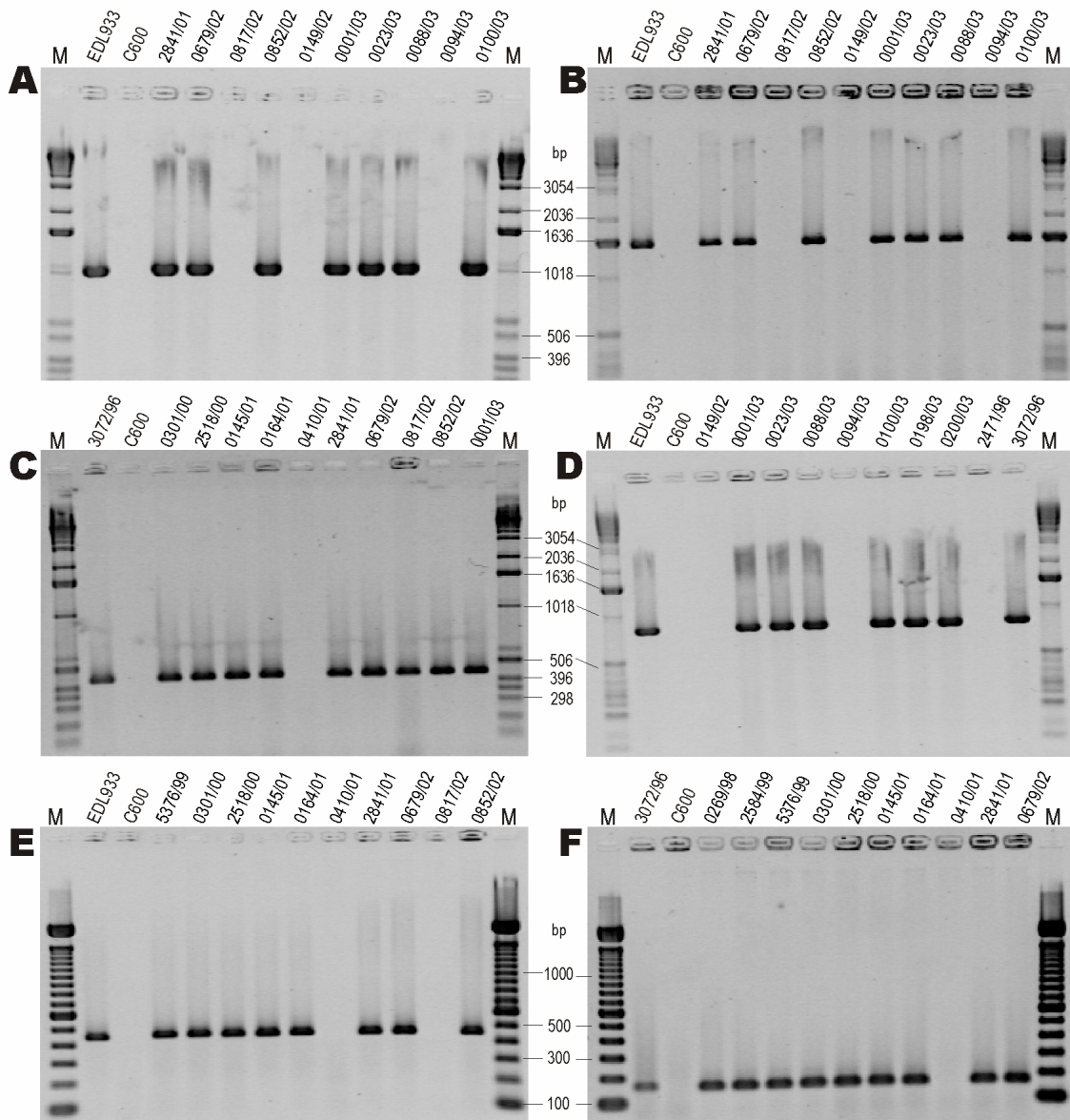
\*SF O157:H<sup>-</sup> der Gruppe 1

\*\*SF O157:H<sup>-</sup> der Gruppe 2

Bei den SF O157:H<sup>-</sup> zeigten mit 32 von 41 Stämmen nur 78% dasselbe Genprofil wie ihr Referenzstamm 3072/96 (Tab. 3.1). Hier konnten sämtliche Gene nachgewiesen werden. In knapp zwanzig Prozent der SF O157:H<sup>-</sup> (acht Stämme) konnten nur die beiden Gene *sfpA* und *traM* gefunden werden, während die PCRs für die Gene *wabB*, *stcE*, *etpD*, und E-*hlyA* negativ ausfielen. Der Stamm 0410/01 trug als einziger keines der untersuchten Gene. In früheren Untersuchungen in unserem Labor konnten jedoch zumindest die Gene *sfpA* und E-*hlyA* bei diesem Stamm mittels PCR nachgewiesen werden. Eine Tabelle aller Ergebnisse findet sich im Anhang (Tab. A).

Zur statistischen Analyse wurden die NSF O157:H7/H<sup>-</sup> und SF O157:H<sup>-</sup> hinsichtlich des Genprofils in je zwei Gruppen klassifiziert. Dabei wurden die zum jeweiligen Referenzstamm identischen Stämmen von denen mit mindestens einem Genverlust unterschieden. Ein Unterschied im Genprofil im Vergleich zum jeweiligen Referenzstamm fand sich damit bei SF O157:H<sup>-</sup> signifikant häufiger als bei NSF O157:H7/H<sup>-</sup> ( $\chi^2=4,009$ ;  $df=1$ ;  $p<0,05$ ).

Vom Stamm 0410/01 abgesehen lassen sich die SF O157:H<sup>-</sup> anhand der Gendistribution Plasmid kodierter Determinanten in zwei Gruppen einteilen: Die Stämme der Gruppe 1 verfügen über alle untersuchten Gene, während bei Gruppe 2 Stämmen nur *sfpA* und *traM* vorliegen, die Gene *wabB*, *stcE*, *etpD*, und *E-hlyA* also fehlen (Abb. 3.1, Tab. 3.1). Für alle sechs untersuchten Genloci sind die PCR-Ergebnisse von jeweils zehn SF O157:H<sup>-</sup> beispielhaft in Abb. 3.2 dargestellt.



**Abb. 3.2** PCR-Produkte von je zehn SF O157:H<sup>-</sup> (Spur 3-12) sowie Positiv- und Negativkontrolle (Spur 1 und 2), M=Molekulargewichtsstandard (A-D, 1 kbp; E-F, 100 bp) A) Amplifikation eines *etpD* Fragments mit dem Primerpaar D1 und D13R. B) Amplifikation eines *E-hlyA* Fragments mit dem Primerpaar hlyA1 und hlyA4. C) Amplifikation eines *sfpA* Fragments mit dem Primerpaar sfpA-U und sfpA-L. D) Amplifikation eines *wabB* Fragments mit dem Primerpaar rfbU-fwd und rfbU-rev. E) Amplifikation eines *stcE* Fragments mit dem Primerpaar stcE-fwd1 und stcE-rev1. F) Amplifikation eines *traM* Fragments mit dem Primerpaar traM-fwd und traM-rev.

### 3.2 Korrelation von Genprofil und Klinik

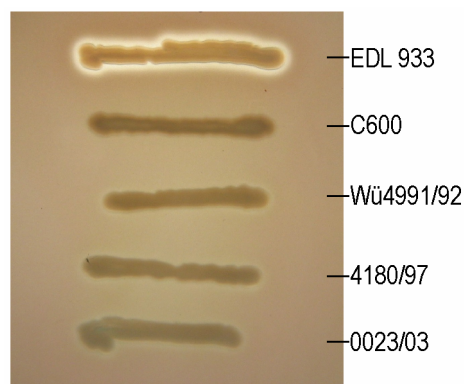
Von den 32 Gruppe 1 SF O157:H<sup>-</sup> Stämmen wurden 87,5% von Patienten isoliert, die ein HUS entwickelten, zwei Isolate entstammten asymptomatischen Patienten und einer einem Patienten mit Diarrhoe. Für einen der Gruppe 1 SF O157:H<sup>-</sup> lagen keine Angaben zur Klinik vor. Bei zur Gruppe 2 gehörigen Isolaten ergab sich mit sieben (87,5%) HUS-Patienten und einem mit Diarrhoe ein fast identisches Bild. Ein Unterschied in der durch SF O157:H<sup>-</sup> hervorgerufenen Klinik zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 Stämmen konnte somit nicht vorgefunden werden.

### 3.3 Sequenzanalyse repräsentativer Stämme

Von je drei repräsentativen NSF O157:H7/H<sup>-</sup> und SF O157:H<sup>-</sup> wurden die PCR-Produkte ansequenziert (Tab. B im Anhang). Sämtliche Sequenzen zeigten eine mindestens 99% Homologie zum jeweiligen Referenzstamm. Somit konnte die Spezifität aller PCR-Protokolle und damit die Ansatzpunkte der Primerpaare (Abb. 3.1) bestätigt werden.

### 3.4 Hämolytischer Phänotyp

Auf Enterohämolysin-Agar war nach 24 h Inkubation um die EDL933 Kolonien ein etwa 1 mm breiter hämolytischer Hof als Ausdruck der phänotypischen Enterohämolyse zu sehen. Sämtliche SF O157:H<sup>-</sup> und C600 waren phänotypisch negativ (Abb. 3.3). Auf Columbia-Blutagar zeigten alle untersuchten Stämme eine  $\gamma$ -Hämolyse.



**Abb. 3.3** Enterohämolyseverhalten von SF O157:H<sup>-</sup> sowie Positiv- und Negativkontrolle. Hämolytischer Hof um die EDL933 Kolonien, keine Hämolyse durch C600 und die drei exemplarisch dargestellten SF O157:H<sup>-</sup>.

### ***3.5 Sicherung der Serotypie ( $rfb_{O157}$ PCR und $fliC$ PCR-RFLP)***

Zur Sicherung der dokumentierten Daten zur Serotypie wurden bei den Gruppe 2 Stämmen und bei 0410/01 mittels PCR das Vorliegen eines O157 ( $rfb_{O157}$ ) und H7 ( $fliC$  RFLP) Genotyps untersucht. Die genannten Stämme waren für  $rfb_{O157}$  positiv, wodurch die Zugehörigkeit zum O157 Komplex erwartungsgemäß gesichert werden konnte. Das RFLP-Muster der  $fliC$  Produkte entsprach bei allen Stämmen dem des Referenzstammes EDL933, während der Stamm C600 andere Fragmente zeigte. Dieses RFLP-Muster war dabei mit dem durch das Internettool REBSites berechneten und mit dem durch Fields et al. [26] publizierten Muster identisch.

## 4 Diskussion

Durch unterschiedliche teils sich ändernde Umweltbedingungen ist es für Bakterien von Vorteil sich durch den Zugewinn oder Verlust von Eigenschaften adaptieren zu können. Diese genomische Flexibilität wird durch unterschiedliche Mechanismen wie Punktmutationen, Rekombinationsereignisse und den Transfer mobiler genetischer Elemente vermittelt [112]. Unter derartigen mobilen Elementen finden sich im Genom von EHEC zum Beispiel Phagen, Pathogenitätsinseln und Plasmide.

Schon früh nach der Erstbeschreibung von EHEC und der besonderen Bedeutung von Stx für die Pathogenese des HUS wurde auf das Plasmid von O157:H7 als Träger weiterer potentieller Virulenzfaktoren hingewiesen [47]. Dessen Erforschung zeigte immer wieder neue potentielle Virulenzfaktoren auf (siehe 1.4.3) und mündete 1998 in der Veröffentlichung der Sequenz des als pO157 designierten Plasmids des Referenzstamms EDL933 [18]. Das regional unterschiedliche Kodonvorkommen und das Vorhandensein zahlreicher Insertionssequenzen (IS) zeigten eine Mosaikstruktur an und deuteten damit auf die Plastizität des Plasmids hin. Das kürzlich sequenzierte Virulenzplasmid pSFO157 des Sorbitol fermentierenden O157:H<sup>-</sup> Stammes 3072/96 spiegelt diese Plastizität unter anderem durch eine zu pO157 differente Genlokalisierung und -ausstattung wider [12]. Schon 1999 wiesen Brunder et al. auf die Variabilität des Virulenzplasmids von EHEC verschiedener Serotypen hin [15]. Dabei zeigten die Serotypen O26, O103, O111 und O157:H<sup>-</sup> Unterschiede in der Genausstattung hinsichtlich der Genloci *katP*, *espP* und *E-hlyA* im Vergleich zu O157:H7 Isolaten. Eine deutliche Varianz im Genprofil innerhalb eines Serotyps war aber nur bei den Serotypen O26, O103 und O111 zu beobachten, welche gemäß der durch Reid et al. nach Multi-Locus-Sequenzierung vorgenommenen Klassifikation dem EHEC 2 Komplex zugerechnet werden [78]. Diese intraserotypischen Unterschiede bezogen sich fast ausschließlich auf Kombinationen der Gene *espP* und *katP*. Bei zwei Stämmen des Serotyps O157:H7 konnten eine Insertion in bzw. eine Deletion eines Teils des *espP* Gens entdeckt werden. Ansonsten war das Genprofil der O157 Stämme des EHEC 1 Komplexes innerhalb der NSF und SF Gruppe einheitlich.



#### **4.1 Variabilität des Virulenzplasmids beim EHEC 1 Komplex**

**NSF O157:H7/H<sup>-</sup>:** Meine Ergebnisse zum Genprofil der O157:H7 Stämme hinsichtlich der Loci *wabB*, *stcE*, *etpD* und *E-hlyA* sind konform mit den Ergebnissen von Brunder et al. [15] in der Hinsicht, dass es nur eine kleine Anzahl an Stämme gibt, die sich vom Referenzstamm EDL933 unterscheiden. Da es hauptsächlich um die Untersuchung der Variabilität des Plasmids der Sorbitol fermentierenden O157:H<sup>-</sup> gehen sollte, wurden die drei Stämme mit PCR-negativen Genen nicht näher untersucht, so dass an dieser Stelle nicht gesagt werden kann, ob es sich dabei wie bei Brunder et al. beschrieben um Deletionen von Teilbereichen oder minimale Sequenzvariationen handelt. In Anbetracht der Tatsache, dass bei einem der drei Stämme nur das *etpD* nicht nachgewiesen werden konnte, alle anderen Gene jedoch vorhanden waren, wären weitere Untersuchungen aber durchaus sinnvoll, um die Ursache der PCR-Negativität zu finden.

Die beiden Stämme (H671/89 und 4660/95), bei denen die aufeinander folgenden Gene *wabB*, *stcE* und *etpD* nicht mittels PCR nachgewiesen werden konnten, könnten dieselbe Deletion aufweisen, welches auf eine klonale Zugehörigkeit hindeuten würde. Eine Deletion des gesamten Bereichs ist auch deshalb denkbar, weil er durch IS Elemente flankiert wird [18, 57, 61]. Diese Theorie wird durch Ergebnisse von Lathem et al. unterstützt. Alle durch sie auf *stcE* und *etpD* getesteten pathogenen *E. coli*, darunter die DEC-Kollektion [107] trugen entweder beide oder keines der beiden Gene, welches eine Kopplung vermuten ließ. Eine solche ist auch aus funktionellen Gesichtspunkten verständlich, da StcE durch das *etp* Typ II Sekretionssystem sekretiert wird [58]. Innerhalb der ersten O55:H7 Gruppe nach Feng et al. (A1) [25] gab es sowohl Stämme die *stcE* und *etpD* positiv waren (DEC 5A, 5C, 5E) als auch welche die für beide Gene negativ waren (DEC 5B, 5D), während als phylogenetisch älter angesehene Stämme die Gene trugen (ECOR37). Deshalb wurde der nachträgliche Verlust beider Gene bei der negativen DEC-Subgruppe angenommen. Ein Verlust dieses Genclusters (inklusive dem benachbarten *wabB*) durch die zwei hier genannten O157:H7 Stämme würde also diesem Ereignis entsprechen.

**SF O157:H<sup>-</sup>:** Die Sorbitol fermentierenden O157:H<sup>-</sup> zeigten eine signifikante Variabilität im Genprofil des Plasmids. Anhand des Genprofils lassen sich die SF O157:H<sup>-</sup> Stämme wie bei den Ergebnissen beschrieben in Gruppe 1 und Gruppe 2 Stämme unterscheiden. Aufgrund der negativen PCR-Ergebnisse für vier aufeinander

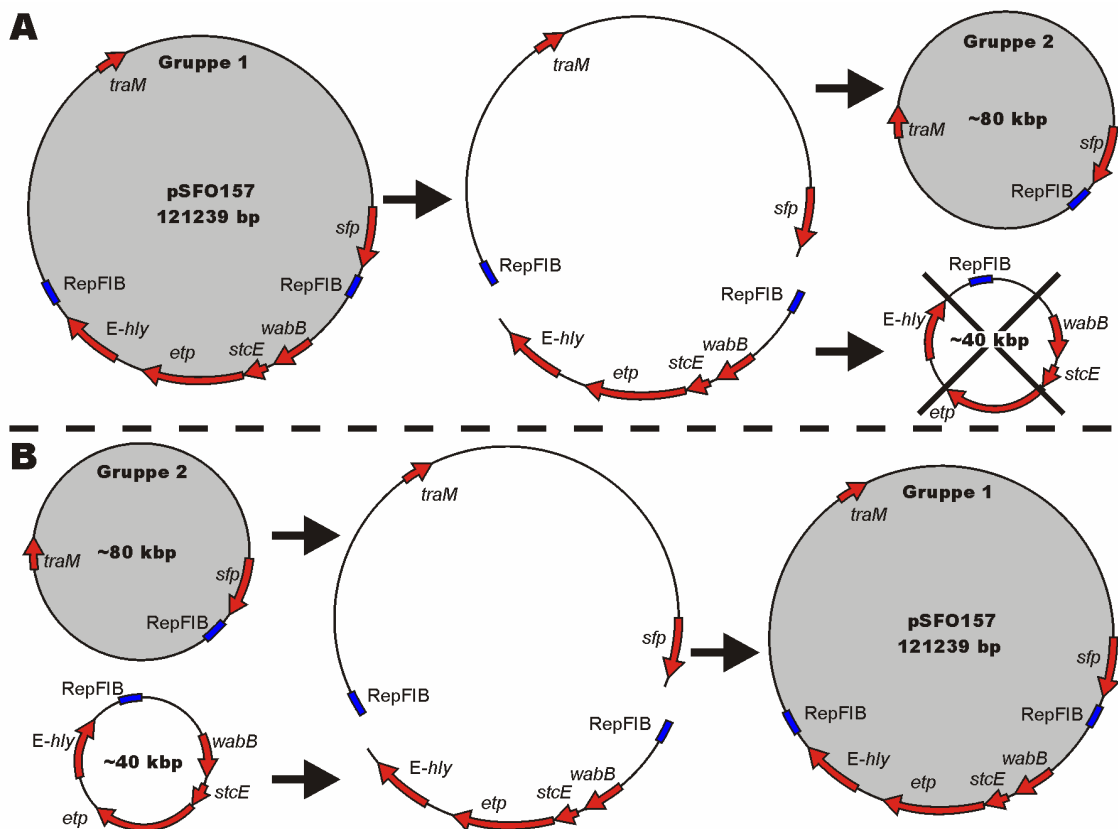
folgende Gene des Plasmids scheiden minimale Sequenzvariationen im Bindungsbereich der Primer als Ursache der Negativbefunde praktisch aus und es muss von einer größeren Deletion ausgegangen werden. Somit beruht die hier gezeigte Variabilität des Plasmids vermutlich nicht auf der Deletion von bzw. der Mutation in einzelnen Genen [15], sondern auf dem Fehlen eines großen Teils des Plasmids des Referenzstammes 3072/96. Dieser Verlust ist umfangreicher als der für die beiden oben genannten O157:H7 Stämme, da zusätzlich zu *wabB*, *stcE* und *etpD* auch *E-hlyA* fehlt. In dieser Arbeit wurde darauf verzichtet, die Gennachweise an isolierten Plasmiden durchzuführen, weshalb nicht auszuschließen ist, dass die nachgewiesenen Gene vereinzelt auch chromosomal vorlagen. Im vollständig sequenzierten Referenzstamm EDL933 [18, 76], der auch bei der Charakterisierung der jeweiligen Gene verwendet wurde [42, 58, 88, 89], und im SF O157:H Stamm 3072/96, dessen Plasmidsequenz publiziert wurde [12], liegen die Gene jedoch eindeutig Plasmid gebunden vor.

## 4.2 Phylogenie von SF O157:H der Gruppe 1 und Gruppe 2

**Entstehungshypothesen der Gruppe 1 und Gruppe 2 Plasmide:** Betrachtet man die beiden unterschiedlichen Plasmide der SF O157:H, stellt sich die Frage wie diese entstanden sind. Die in der Gruppe 2 fehlenden Gene *wabB*, *stcE*, *etpD* und *E-hlyA* liegen hintereinander auf dem Plasmid pSFO157 (Stamm 3072/96) auf einem etwa 30 kbp langen Abschnitt zwischen *sfpA* und *traM* (Abb. 3.1). Der Bereich von *sfpA* bis *traM* ist inklusive dieses 30 kbp Abschnitts etwa 75 kbp groß. Der Größenunterschied zwischen Plasmiden der Gruppe 1 und denen der Gruppe 2 müsste demnach minimal 30 kbp und maximal 75 kbp betragen. Der zur Gruppe 1 gehörige Referenzstamm 3072/96 besitzt ein etwa 120 kbp großes Plasmid, womit Gruppe 2 Plasmide 45 kbp bis 90 kbp groß sein müssten. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten Plasmidprofile von Gruppe 2 Stämmen angefertigt werden.

Der in Gruppe 2 Stämmen fehlende Genbereich wird auf dem Plasmid pSFO157 durch Replikationsursprünge (RepFIB) flankiert [12], welches auf die Entstehung der beiden unterschiedlichen Plasmide hindeutet. So könnte sowohl das Gruppe 2 Plasmid als auch das Gruppe 1 Plasmid der Vorgänger des jeweils anderen gewesen sein. Im Folgenden sollen diese beiden Hypothesen gegenübergestellt werden.

Bei der Entstehung des kleineren Gruppe 2 Plasmids aus dem ~120 kbp großen Gruppe 1 Plasmid wäre der Verlust des *wabB*, *stcE*, *etpD* und *E-hlyA* tragenden Plasmidbereiches der zu Grunde liegende Mechanismus (Abb. 4.1 A). Der Beginn der Replikation des großen Plasmids im Bereich des in der Abbildung links dargestellten RepIB mit einem frühzeitigen Abbruch zwischen *sfpA* und *wabB* könnte eine derartige Deletion hervorgerufen haben. Auf diese Weise würde ein etwa 40 kbp großer Bereich deletiert und ein etwa 80 kbp großes Plasmid zurückbleiben, welches von seiner Genausstattung und Größe dem Gruppe 2 Plasmid entspräche.



**Abb. 4.1** Hypothesen zur Entstehung der zwei Plasmidgruppen von SF O157:H. A) 121 kbp Plasmid als Ursprung, bei dem durch Verlust eines Abschnitts mit *E-hlyA*, *etpD*, *stcE* und *wabB* das Gruppe 2 Plasmid mit nur den Makergenen *traM* und *sfpA* entstanden ist. B) Das 121 kbp große Gruppe 1 Plasmid ist aus einer Fusion des Gruppe 2 Plasmids (*traM*, *sfpA*) mit einem zweiten Plasmid entstanden. Grau unterlegt sind die hypothetischen Gruppe 1 und Gruppe 2 Plasmide, deren Genstruktur in der Arbeit nachgewiesen wurde.

In der zweiten Hypothese (Abb. 4.1 B) könnte das Gruppe 1 Plasmid aus der Fusion zweier Replicons entstanden sein, wobei eines dieser Replicons das Gruppe 2 Plasmid wäre und das zweite die Gene *wabB*, *stcE*, *etpD* und *E-hlyA* tragen würde. Jedoch wird ein frühzeitiger Erwerb des *stcE-etpD*-Clusters in Vorfahren der EHEC 1 Stämme angenommen, während das *E-hly* vermutlich erst zu einem späteren Zeitpunkt in das

Plasmid integriert wurde [57], welches gegen die zweite Hypothese spricht. An dieser Stelle wird deshalb die in Abb. 4.1 A dargestellte Hypothese favorisiert.

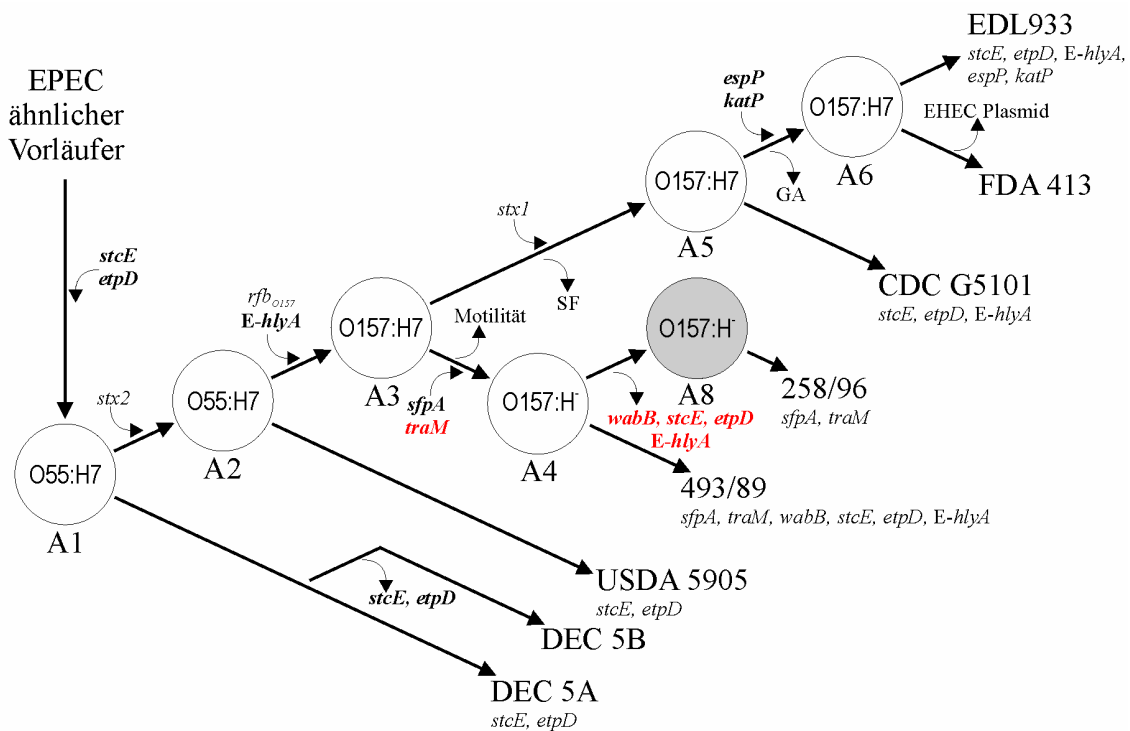
Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Gruppe 2 Stämme wirklich einer klonalen Gruppe angehören. In diesem Fall wäre zunächst ein Stamm entstanden, aus dem die anderen hervorgegangen sind. Zum jetzigen Zeitpunkt kommt auch noch eine mehrzeitige Entstehung in Betracht. Eine solche würde jedoch ein und dieselbe Deletion im Sinne der eben dargestellten Hypothese zu verschiedenen Zeitpunkten nötig machen. Diese wäre aber aus phylogenetischen Betrachtungen nur durch einen immer wiederkehrenden Mechanismus erklärbar, für den es bisher kein beschriebenes Korrelat gibt. So ist die Betrachtung der hier beschriebenen Gruppe 2 SF O157:H<sup>-</sup> als klonale Gruppe begründet.

Die hier vorgenommene Unterteilung unterscheidet sich von der durch Liesegang et al. [59] beschriebenen, die SF O157:H<sup>-</sup> anhand von Elektrophoresetyp, P Gen Profil (genomische Position des Lambda Phagen anhand des P Gens) und PFGE-Muster in zwei klonale Typen differenzierten. Dabei trugen jedoch alle SF O157:H<sup>-</sup> unabhängig vom klonalen Typ das *E-hlyA* Gen, welches in der von mir beschriebenen Gruppe 2 fehlt. Weitere genomische Untersuchungen der Gruppe 2 Stämme (zum Beispiel entsprechend der eben genannten durch Liesegang et al. verwendeten Methoden) könnten zur weitergehenden Charakterisierung dieser Stämme sinnvoll sein, um gegebenenfalls zusätzliche gemeinsame Unterschiede zu Gruppe 1 Stämmen aufzuzeigen und so die Klonalität zu untermauern. Hierbei ist zu beachten, dass bei SF O157:H<sup>-</sup> und O157:H7 eine Variabilität des PFGE-Musters nach Subkultivierung beschrieben wurde, welche durch Veränderungen in der genomischen Position von *stx<sub>2</sub>* bzw. Rekombinationsereignissen zwischen Prophagenregionen bedingt waren [9, 38]. Diese Variabilität muss dementsprechend bei der Interpretation von PFGE-Mustern beachtet werden.

#### **Position von Gruppe 2 SF O157:H<sup>-</sup> im Evolutionsmodell des EHEC 1 Komplexes:**

Unter der Annahme einer Entstehung der Gruppe 2 Stämme als klonale Gruppe aus einem Gruppe 1 Klon, lässt sich die Gruppe 2 im bestehenden Evolutionsmodell nach Feng et al. [25] positionieren. Nachdem seit 1993 durch MLEE-Analysen [107] die Entwicklung des O157:H7 Komplexes aus einem O55:H7 Vorfahren vermutet wird, schlugen Feng et al. 1998 [25] darauf aufbauend und mit zusätzlichen MLEE- und

Mutationsanalyse-Daten ein Stufenmodell bezüglich dieser Evolution vor. In diesem Modell wird der Erwerb und Verlust von Virulenzfaktoren und phänotypischen Charakteristika wie Motilität und Sorbitolfermentation in definierten evolutiven Schritten postuliert, die zur Entwicklung verschiedener Varianten innerhalb des O157:H7 Komplexes geführt haben. Dieses Modell konnte durch zahlreiche Untersuchungen untermauert und erweitert werden, indem der Erwerb oder Verlust einzelner im ursprünglichen Modell nicht berücksichtigter Gene [29, 57] oder Mutationen [65] mit integriert wurde.



**Abb. 4.2** Evolutionsmodell des O157:H7 Komplexes modifiziert nach Feng et al. [25] und erweitert um die Ergebnisse von Lathem et al. [57], Friedrich et al. [29] und dieser Arbeit (rot). Geschwungene Pfeile markieren den Erwerb oder Verlust von Genen bzw. phänotypischen Charakteristika, wobei Plasmid kodierte Gene fett hervorgehoben sind. Rechts sind jeweils repräsentative Stämme mit ihrem Profil Plasmid kodierter Gene aufgelistet. GA= $\beta$ -Glucoranidaseaktivität; SF=Sorbitolfermentation. Mit A1-A6 sind die Ahnen entsprechend der Beschreibung von Feng et al. bezeichnet. Grau unterlegt und mit A8 gekennzeichnet ist der in dieser Arbeit beschriebene Gruppe 2 Klon Sorbitol fermentierender O157:H'.

In Abb. 4.2 wird dieses Evolutionsmodell um meine Ergebnisse erweitert mit dem besonderen Fokus auf Plasmid kodierte Determinanten. Lathem et al. schlugen dabei die Aquirierung des *stcE-etsD*-Clusters vor dem O55:H7 Ahnen A1, den Erwerb des *E-hlyA* von A2 nach A3 und von *katP* und *espP* durch A6 vor [57]. Nach Friedrich et al. [29] wird die Integration des *sfpA* Gens in den Genpool der EHEC bei der Abspaltung des SF O157:H' Klons von der O157:H7 Linie vermutet. Meine Ergebnisse legen einen

gleichzeitigen Erwerb des *traM* nahe. Die acht beschriebenen Stämme mit Gruppe 2 Plasmiden entsprechen dem als A8 bezeichneten und grau unterlegten Klon, für den stellvertretend der Stamm 258/98 aufgeführt ist. Sie sind vermutlich aus einem das komplette Plasmid tragende Gruppe 1 Stamm (A4) hervorgegangen und haben dabei die Gene *wabB*, *stcE*, *etpD* und *E-hlyA* verloren.

### ***4.3 Klinische und diagnostische Wertigkeit der Plasmidgene***

Erkrankungen durch Gruppe 1 oder Gruppe 2 SF O157:H<sup>-</sup> unterschieden sich nicht in der Häufigkeit des Auftretens eines HUS. Da in den Gruppe 2 Stämmen jedoch die Gene *wabB*, *stcE*, *etpD* und *E-hlyA* fehlen, sind diese sicherlich nicht essentiell für die Pathogenese schwerer Krankheitsverläufe. Der sich hier im Genverlust zeigenden Mobilität genetischer Elemente muss jedoch eine wesentliche Bedeutung in der Anpassungsfähigkeit und damit Virulenz von EHEC zugesprochen werden. Die Relevanz derartiger mobiler Elemente zeigt sich zum Beispiel in der Hochregulation von Phagen kodierten und an Rekombination beteiligten Genen als Reaktion auf subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen [37, 111].

Das Genprodukt von *wabB* hat eine Funktion in der Synthese des Kern-Oligosaccharids des O157 LPS. Die durch das Enzym vorgenommene Modifikation der Seitenkette (Transfer eines N-Acetylglucosamins auf eine Heptose im inneren Kernbereich des Oligosaccharids) findet aber nicht an allen LPS-Molekülen eines Bakteriums statt und ist auch nicht bei allen O157 Stämmen nachweisbar [42]. Aus den vorliegenden Ergebnissen wird dieses ungeachtet potentieller Unterschiede in der Expression des Proteins verständlich, da einige Stämme schon genotypisch negativ für das kodierende Gen sind (zwei O157:H7 und acht SF O157:H<sup>-</sup>). Zudem zeigen alle in dieser Arbeit sequenzierten Stämme mit der Deletion eines einzelnen Thymins innerhalb von *wabB* eine Frame-shift-Mutation gegenüber der publizierten Sequenz von EDL933.

Hinsichtlich der Diagnostik von SF O157:H<sup>-</sup> wird das von Friedrich et al. [29] vorgestellte Protokoll zur Identifizierung dieses Serotyps unterstrichen. Durch das Fehlen einiger Virulenzgene in den Gruppe 2 Stämmen, insbesondere des *E-hlyA*, sind Screening- oder Nachweisverfahren, die auf den Nachweis des Hämolyse Phäno- oder Genotyps abzielen, hier nicht ausreichend. Durch Schmidt et al. [90] wurde schon bei Charakterisierung des *E-hly* Genclusters auf das mangelnde phänotypische Korrelat

einiger genotypisch positiver Stämme hingewiesen. In dieser Arbeit konnte dieses Phänomen für alle untersuchten Sorbitol fermentierenden O157:H<sup>-</sup> nachgewiesen werden, welches konsistent mit Ergebnissen aus weiteren Studien zu SF O157:H<sup>-</sup> ist, in denen zwischen 0% und 12% der untersuchten Isolate einen enterohämolytischen Phänotyp trotz eines positiven Genotyps zeigten [3, 10, 44].

#### **4.4 Plasmidverlust *in vitro***

Der SF O157:H<sup>-</sup> Stamm 0410/01 war für alle untersuchten Gene PCR-negativ, in früheren Untersuchungen in unserem Labor jedoch zumindest für *sfpA* und *E-hlyA* positiv. Diese widersprüchlichen Ergebnisse deuten auf einen Plasmidverlust *in vitro* hin. Ein ähnliches Ereignis wurde auch für den NSF O157:NM Stamm FDA 413 (siehe Abb. 4.2) vermutet, dem alle fünf durch Lathem et al. [57] getesteten Plasmid kodierten Virulenzfaktoren fehlten. Für diesen Stamm lagen jedoch keine Berichte über die Präsenz Plasmid kodierter Gene zu einem früheren Zeitpunkt vor, so dass auch ein Plasmidverlust *in vivo* diskutiert wurde. Beim Stamm 0410/01 ist aber von einem Plasmidverlust unter experimentellen Bedingungen auszugehen. Da es sich meines Wissens um die erste Beschreibung eines solchen bei EHEC handelt, ist die Häufigkeit eines derartigen Ereignisses weitaus geringer zu vermuten als zum Beispiel für die Phagen kodierten Shiga-Toxine, für die bei einem Drittel eines untersuchten Kollektivs ein Toxinverlust nach Subkultivierung nachgewiesen wurde [49]. *In vivo* konnte für *stx* kürzlich der Verlust des Gens bei etwa 5% von zuvor *stx*-positiven Stämmen aus dem Stuhl von HUS-Patienten nachgewiesen werden [64].

Für die vorgeschlagene Identifikation von SF O157:H<sup>-</sup> über die Bestimmung des *sfpA* [29] hat diese Beobachtung in so fern keine Konsequenz, als dass der Stamm zum Zeitpunkt der Isolation *sfpA* positiv war und somit als SF O157:H<sup>-</sup> hätte identifiziert werden können. Jedoch lässt der Verlust des Plasmids *in vitro* die Frage entstehen, wie stabil dieses *in vivo* ist. Ein frühzeitiger Plasmidverlust könnte nämlich ein diagnostisches Kriterium zu Nichte machen. In solch einem Fall wäre ein Plasmid unabhängiger Nachweis nötig.

#### ***4.5 Ausblick***

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit über eine Variabilität bei SF O157:H<sup>-</sup> des EHEC 1 Komplexes berichtet wird, die sich in der Abwesenheit Plasmid kodierter Virulenzgene bei einigen hier als Gruppe 2 definierten Isolaten im Vergleich zum bisher beschriebenen Virulenzprofil zeigt. Dieser Unterschied ist durch einen Verlust eines Genabschnitts des Plasmids erklärbar. Eine endgültige Aussage zur Klonalität dieser neuen Gruppe an SF O157:H<sup>-</sup> kann über weitere genomische Untersuchungen (wie in 4.2 vorgeschlagen) erreicht werden.



## 5 Literaturverzeichnis

- [1] **Allerberger F, Dierich MP, Gruber-Moesenbacher U, Liesegang A, Prager R, Hartmann G, Rabsch W, Tschäpe H, Karch H** (2000) Nontoxicogenic sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> associated with a family outbreak of diarrhoea. *Wien Klin Wochenschr* 112(19): 846-850
- [2] **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-410
- [3] **Ammon A, Petersen LR, Karch H** (1999) A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>. *J Infect Dis* 179(5): 1274-1277
- [4] **Bales S, Schnitzler N** (2000) Neues Infektionsschutzgesetz. Melde- und Aufzeichnungspflicht für Krankheiten und Krankheitserreger. *Dt Ärztebl* 97: A 3501-3508
- [5] **Banatvala N, Griffin PM, Greene KD, Barrett TJ, Bibb WF, Green JH, Wells JG** (2001) The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis* 183(7): 1063-1070
- [6] **Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG** (1994) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272(17): 1349-1353
- [7] **Bell BP, Griffin PM, Lozano P, Christie DL, Kobayashi JM, Tarr PI** (1997) Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 100(1): E12
- [8] **Bettelheim KA, Whipp M, Djordjevic SP, Ramachandran V** (2002) First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) belonging to O group O157. *J Med Microbiol* 51(8): 713-714
- [9] **Bielaszewska M, Prager R, Zhang W, Friedrich AW, Mellmann A, Tschäpe H, Karch H** (2006) Chromosomal dynamism in progeny of outbreak-related sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Appl Environ Microbiol* 72(3): 1900-1909

- [10] **Bielaszewska M, Schmidt H, Karmali MA, Khakhria R, Janda J, Bláhová K, Karch H** (1998) Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> strains in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 36(7): 2135-2137
- [11] **Blaser MJ** (2004) Bacteria and diseases of unknown cause: hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis* 189(3): 552-555
- [12] **Brunder W, Karch H, Schmidt H** (2006) Complete sequence of the large virulence plasmid pSFO157 of the sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> strain 3072/96. *Int J Med Microbiol* 296(7): 467-474
- [13] **Brunder W, Karch H** (2000) Genome plasticity in Enterobacteriaceae. *Int J Med Microbiol* 290(2): 153-165
- [14] **Brunder W, Khan AS, Hacker J, Karch H** (2001) Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>. *Infect Immun* 69(7): 4447-4457
- [15] **Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H** (1999) The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 145(Pt 5): 1005-1014
- [16] **Brunder W, Schmidt H, Karch H** (1996) KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142(Pt 11): 3305-3315
- [17] **Brunder W, Schmidt H, Karch H** (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24(4): 767-778
- [18] **Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR** (1998) The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26(18): 4196-4204
- [19] **Center for Disease Control and Prevention** (1995) Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM--South Australia 1995. *Morb Mortal Wkly Rep* 44(29): 550-551, 557-558
- [20] **Cimolai N, Basalyga S, Mah DG, Morrison BJ, Carter JE** (1994) A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol* 42(2): 85-89

- [21] **Clarke SC** (2001) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* -- an emerging problem? *Diagn Microbiol Infect Dis* 41(3): 93-98
- [22] **Cowden JM** (1997) Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157, November-December 1996. *Euro Surveill* 2(1): 1-2
- [23] **Davidson G, Barnes G, Bass D, Cohen M, Fasano A, Fontaine O, Guandalini S** (2002) Infectious diarrhea in children: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35 Suppl 2: S143-150
- [24] **Dundas S, Todd WT, Stewart AI, Murdoch PS, Chaudhuri AK, Hutchinson SJ** (2001) The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the hemolytic uremic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 33(7): 923-931
- [25] **Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS** (1998) Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 177(6): 1750-1753
- [26] **Fields PI, Blom K, Hughes HJ, Hesel LO, Feng P, Swaminathan B** (1997) Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J Clin Microbiol* 35(5): 1066-1070
- [27] **Friedrich AW, Bielaszewska M, Karch H** (2002) Diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *J Lab Med* 26: 183-190
- [28] **Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H** (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185(1): 74-84
- [29] **Friedrich AW, Nierhoff KV, Bielaszewska M, Mellmann A, Karch H** (2004) Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 42(10): 4697-4701
- [30] **Fruth A, Prager R, Friedrich AW, Kuczius T, Roggentin P, Karch H, Ammon A, Bockemühl J, Tschäpe H** (2002) Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik

- Deutschland von 1998 bis 2001. Bundesgesundheitsbl 45: 715-721
- [31] **Fruth A, Richter H, Timm M, Streckel W, Klie H, Prager R, Reissbrodt R, Gallien P, Skiebe E, Rienäcker I, Karch H, Bockemühl J, Perlberg K, Tschäpe H** (2000) Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl 43: 310-317
- [32] **Fukushima H, Hashizume T, Morita Y, Tanaka J, Azuma K, Mizumoto Y, Kaneno M, Matsuura M, Konma K, Kitani T** (1999) Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatr Int* 41(2): 213-217
- [33] **Garg AX, Suri RS, Barrowman N, Rehman F, Matsell D, Rosas-Arellano MP, Salvadori M, Haynes RB, Clark WF** (2003) Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *JAMA* 290(10): 1360-1370
- [34] **Gerber A, Karch H, Allerberger F, Verweyen HM, Zimmerhackl LB** (2002) 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* 186(4): 493-500
- [35] **Gill CJ, Hamer DH, Lau J** (2002) Risk of hemolytic uremic syndrome from antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 colitis. *JAMA* 288(24): 3110-3111; author reply 3112
- [36] **Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA** (2005) The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* 73(3): 1295-1303
- [37] **Herold S, Siebert J, Huber A, Schmidt H** (2005) Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 49(3): 931-944
- [38] **Iguchi A, Iyoda S, Terajima J, Watanabe H, Osawa R** (2006) Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the *Escherichia coli* O157:H7 chromosome. *Gene* 372: 199-207
- [39] **Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H**

- (2003) Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 71(6): 3634-3638
- [40] **Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Karch H** (2002) Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (*efa1*) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: H<sup>-</sup>. *Int J Med Microbiol* 292(3-4): 207-214
- [41] **Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD, Tarr PI** (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* 188(5): 719-729
- [42] **Kaniuk NA, Vinogradov E, Li J, Monteiro MA, Whitfield C** (2004) Chromosomal and plasmid-encoded enzymes are required for assembly of the R3-type core oligosaccharide in the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279(30): 31237-31250
- [43] **Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H** (1999) Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34(3): 229-243
- [44] **Karch H, Bielaszewska M** (2001) Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol* 39(6): 2043-2049
- [45] **Karch H, Bockemühl J, Huppertz H** (2000) Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Dt Ärztebl* 97: A 2314-2318
- [46] **Karch H, Böhm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J** (1993) Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>. *J Clin Microbiol* 31(5): 1200-1205
- [47] **Karch H, Heesemann J, Laufs R, O'Brien AD, Tacket CO, Levine MM** (1987) A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 55(2): 455-461
- [48] **Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic S, Datz M** (1996) Isolation of

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* 34(3): 516-519
- [49] **Karch H, Meyer T, Rüssmann H, Heesemann J** (1992) Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun* 60(8): 3464-3467
- [50] **Karch H, Wiss R, Glöning H, Emmrich P, Aleksic S, Bockemühl J** (1990) Hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*. *Dtsch Med Wochenschr* 115(13): 489-495
- [51] **Karmali MA** (2004) Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis* 189(3): 355-359
- [52] **Keskimäki M, Saari M, Heiskanen T, Siitonen A** (1998) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 36(12): 3641-3646
- [53] **Klein EJ, Stapp JR, Clausen CR, Boster DR, Wells JG, Qin X, Swerdlow DL, Tarr PI** (2002) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: a prospective point-of-care study. *J Pediatr* 141(2): 172-177
- [54] **Kosek M, Bern C, Guerrant RL** (2003) The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 81(3): 197-204
- [55] **Koyange L, Ollivier G, Muyembe J, Kebela B, Gouali M, Germani Y** (2004) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, Kinshasa. *Emerg Infect Dis* 10(5): 968-969
- [56] **Lathem WW, Bergsbaken T, Welch RA** (2004) Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *J Exp Med* 199(8): 1077-1087
- [57] **Lathem WW, Bergsbaken T, Witowski SE, Perna NT, Welch RA** (2003) Acquisition of *stcE*, a C1 esterase inhibitor-specific metalloprotease, during the evolution of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 187(12): 1907-1914
- [58] **Lathem WW, Grys TE, Witowski SE, Torres AG, Kaper JB, Tarr PI, Welch RA** (2002) StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli*

- O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* 45(2): 277-288
- [59] **Liesegang A, Sachse U, Prager R, Claus H, Steinrück H, Aleksic S, Rabsch W, Voigt W, Fruth A, Karch H, Bockemühl J, Tschäpe H** (2000) Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H<sup>-</sup> in Germany--a ten-year study. *Int J Med Microbiol* 290(3): 269-278
- [60] **Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, Foster JW** (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62(9): 3094-3100
- [61] **Makino K, Ishii K, Yasunaga T, Hattori M, Yokoyama K, Yutsudo CH, Kubota Y, Yamaichi Y, Iida T, Yamamoto K, Honda T, Han CG, Ohtsubo E, Kasamatsu M, Hayashi T, Kuhara S, Shinagawa H** (1998) Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res* 5(1): 1-9
- [62] **McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB** (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(5): 1664-1668
- [63] **Mead PS, Griffin PM** (1998) *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352(9135): 1207-1212
- [64] **Mellmann A, Bielaszewska M, Zimmerhackl LB, Prager R, Harmsen D, Tschäpe H, Karch H** (2005) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. *Clin Infect Dis* 41(6): 785-792
- [65] **Monday SR, Whittam TS, Feng PC** (2001) Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of beta-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 184(7): 918-921
- [66] **Mølbak K, Mead PS, Griffin PM** (2002) Antimicrobial therapy in patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection. *JAMA* 288(8): 1014-1016
- [67] **Mülhardt C** (2003) *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics, Spektrum, Heidelberg* [u.a.]
- [68] **Nagano I, Kunishima M, Itoh Y, Wu Z, Takahashi Y** (1998) Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain

- reaction. *Microbiol Immunol* 42(5): 371-376
- [69] **Nataro JP, Kaper JB** (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1): 142-201
- [70] **Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM** (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* 35(2): 275-288
- [71] **O'Brien AD, Lively TA, Chang TW, Gorbach SL** (1983) Purification of Shigella dysenteriae 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. *Lancet* 2(8349): 573
- [72] **O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A, Jackson MP, Olsnes S, Sandvig K, Lindberg AA, Keusch GT** (1992) Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 180: 65-94
- [73] **O'Loughlin EV, Robins-Browne RM** (2001) Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect* 3(6): 493-507
- [74] **Ochoa TJ, Cleary TG** (2003) Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr Opin Infect Dis* 16(3): 259-263
- [75] **Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC** (2004) A new family of potent AB<sub>5</sub> cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med* 200(1): 35-46
- [76] **Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A** (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409(6819): 529-533
- [77] **Prager R, Reissbrodt R, Holler H, Gericke B, Aleksic S, Claus H, Wagner H, Tschäpe H** (1998) Isolierung und Charakterisierung von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* -Stämmen aus Stuhlproben: Ergebnisse einer Sentinel-Studie. *Bundesgesundhbl* 41/Sonderheft: 6-9
- [78] **Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK, Whittam TS** (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406(6791): 64-67



- [79] **Richards A, Goodship JA, Goodship THJ** (2002) The genetics and pathogenesis of haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11(4): 431-435
- [80] **Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML** (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308(12): 681-685
- [81] **Robert Koch Institut** (2003) Ein HUS-Ausbruch durch Sorbitolfermentierende EHEC des Serovars O157:H<sup>-</sup>: Untersuchungsergebnisse und Lehren für die Surveillance. *Epidemiol Bull* 2003(22): 172-175
- [82] **Robert Koch Institut** (2004) Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003. Surveillance-Daten und Trends. *Epidemiol Bull* 2004(31): 251-254
- [83] **Robert Koch Institut** (2001) Ratgeber Infektionskrankheiten. 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). <[http://www.rki.de/INFEKT/INFEKT.HTM?/INFEKT/INF\\_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM&1](http://www.rki.de/INFEKT/INFEKT.HTM?/INFEKT/INF_A-Z/RATGEBER/RAT6.HTM&1)> (aufgerufen 8/2004)
- [84] **Robert Koch Institut** (2004) Risikofaktoren für sporadische STEC(EHEC)-Erkrankungen. *Epidemiol Bull* 2004(50): 433-436
- [85] **Robert Koch Institut** (2005) Risikofaktoren für sporadische STEC-Infektionen: Empfehlungen für die Prävention. *Epidemiol Bul* 2005(1): 1-3
- [86] **Safdar N, Said A, Gangnon RE, Maki DG** (2002) Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis: a meta-analysis. *JAMA* 288(8): 996-1001
- [87] **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467
- [88] **Schmidt H, Beutin L, Karch H** (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63(3): 1055-1061
- [89] **Schmidt H, Henkel B, Karch H** (1997) A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* 148(2): 265-272

- [90] **Schmidt H, Kernbach C, Karch H** (1996) Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142(Pt 4): 907-914
- [91] **Schmidt H, Scheef J, Huppertz HI, Frosch M, Karch H** (1999) *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H<sup>-</sup> strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 37(11): 3491-3496
- [92] **Scottish Centre for Infection and Environmental Health** (2002) Sorbitol-fermenting, verotoxigenic *E. coli* O157. *SCIEH Wkly Rep* 43: 281
- [93] **Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell HDJ, Geldreich E, Payne BJ, Meyer AJ, Wells JG** (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* 117(10): 812-819
- [94] **Tarr PI, Bilge SS, Vary JCJ, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE** (2000) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 68(3): 1400-1407
- [95] **Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL** (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365(9464): 1073-1086
- [96] **Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO** (1990) *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis* 162(2): 553-556
- [97] **Tarr PI, Neill MA** (2001) *Escherichia coli* O157:H7. *Gastroenterol Clin North Am* 30(3): 735-751
- [98] **Tarr PI, Watkins SL, Neill MA** (2002) Risk of hemolytic uremic syndrome from antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 colitis. *JAMA* 288(24): 3111-3112; author reply 3112
- [99] **Tarr PI** (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 20(1): 1-8; quiz 9-10

- [100] **Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C** (2001) *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69(11): 6660-6669
- [101] **te Loo DM, Monnens LA, van Der Velden TJ, Vermeer MA, Preyers F, Demacker PN, van Den Heuvel LP, van Hinsbergh VW** (2000) Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* 95(11): 3396-3402
- [102] **Tilden JJ, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB, Hollingsworth J, Morris JGJ** (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 86(8 Pt 1): 1142-1145
- [103] **Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB** (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70(10): 5416-5427
- [104] **Torres AG, Kaper JB** (2003) Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* 71(9): 4985-4995
- [105] **Verweyen HM, Karch H, Brandis M, Zimmerhackl LB** (2000) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr Nephrol* 14(1): 73-83
- [106] **Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK** (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* 18(3): 512-520
- [107] **Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Ørskov F, Ørskov I, Wilson RA** (1993) Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* 61(5): 1619-1629
- [108] **Wong CS, Brandt JR** (2002) Risk of hemolytic uremic syndrome from antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 colitis. *JAMA* 288(24): 3111; author reply 3112
- [109] **Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI** (2000) The risk of the

- hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. N Engl J Med 342(26): 1930-1936
- [110] **World Health Organization** (1999) New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. Part II. Wkly Epidemiol Rec 74(14): 105-111
- [111] **Zhang W, Bielaszewska M, Friedrich AW, Kuczius T, Karch H** (2005) Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 71(1): 558-561
- [112] **Ziebuhr W, Ohlsen K, Karch H, Korhonen T, Hacker J** (1999) Evolution of bacterial pathogenesis. Cell Mol Life Sci 56(9-10): 719-728
- [113] **Ziese T, Anderson Y, de Jong B, Löfdahl S, Ramberg M** (1996) Outbreak of *Escherichia coli* O157 in Sweden. Euro Surveill 1(1): 2-3
- [114] **Zschöck M, Hamann HP, Kloppert B, Wolter W** (2000) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett Appl Microbiol 31(3): 203-208

## 6 Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| Abb.           | Abbildung                                      |
| Acc. No.       | accession number                               |
| asyp.          | asymptomatisch                                 |
| BLAST          | Basic Local Alignment Search Tool              |
| bp             | Basenpaare                                     |
| CT-SMAC        | Cefixim-Tellurit-Sorbitol-McConkey-Agar        |
| D              | Diarrhoe                                       |
| DEC            | diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>          |
| DNA            | desoxyribonucleic acid                         |
| dNTP           | Desoxynukleotidtriphosphat                     |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                        |
| Eae            | <i>E. coli</i> attachment effacement, Intimin  |
| ECOR           | <i>E. coli</i> standard reference              |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat                       |
| EHEC           | enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>   |
| E-Hly          | EHEC Hämolysin                                 |
| EPEC           | enteropathogene <i>Escherichia coli</i>        |
| EspP           | extracellular serine protease, plasmid-encoded |
| Etp            | EHEC type II secretion pathway                 |
| fwd            | forward  |
| gal            | Galaktose                                      |
| Gb3            | Globotriaosylceramid                           |
| glu            | Glukose  |
| HC             | Hämorrhagische Colitis                         |
| HPLC           | high pressure liquid chromatography            |
| HUS            | hämolytisch-urämisches Syndrom                 |
| IfSG           | Infektionsschutzgesetz                         |
| IMS            | Immunmagnetische Separation                    |
| IS             | Insertionssequenz                              |
| k.A.           | keine Angaben                                  |
| KatP           | Katalase/Peroxidase                            |

---

|                |   |
|----------------|---|
| kbp            | Kilobasenpaare  |
| LDH            | Laktatdehydrogenase                                     |
| LEE            | locus of enterocyte effacement                          |
| LM             | Lebensmittel  |
| LPS            | Lipopolysaccharid                                       |
| MLEE           | Multilocus-Enzym-Elektrophorese                         |
| n.b.           | nicht bekannt   |
| ND             | not determined  |
| NM             | non-motile  |
| NSF            | nicht Sorbitol fermentierend                            |
| PCR            | polymerase chain reaction                               |
| PFGE           | Pulsfeldgelelektrophorese                               |
| pO157          | Plasmid von EHEC O157:H7                                |
| pSFO157        | Plasmid von SF EHEC O157:H7                             |
| REBASE         | Restriction Enzyme Database                             |
| r.             | redone (wiederholt zu einem späteren Zeitpunkt)         |
| rev            | reverse   |
| RFLP           | Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus             |
| SF             | Sorbitol fermentierend                                  |
| Sfp            | sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded |
| SMAC           | Sorbitol-MacConkey-Agar                                 |
| StcE           | secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC    |
| STEC           | Shiga-Toxin produzierende <i>Escherichia coli</i>       |
| Stx            | Shiga-Toxin   |
| Tab.           | Tabelle   |
| Taq-Polymerase | <i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase                 |
| TBE            | Tris-Borsäure-EDTA                                      |
| ToxB           | Toxin B   |
| Tris           | Trishydroxyethylaminoethan                              |
| tRNA           | transfer ribonucleic acid                               |
| U/min          | Umdrehungen pro Minute                                  |

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Abb. 1.1</b> | Synopsis der Klinik von EHEC-Infektionen. ....   | 5  |
| <b>Abb. 3.1</b> | Lokalisation der untersuchten Gene bzw. Gencluster auf den Plasmiden pSFO157 und pO157. .... | 21 |
| <b>Abb. 3.2</b> | PCR-Produkte von je zehn SF O157:H <sup>-</sup> sowie Positiv- und Negativkontrolle .....    | 23 |
| <b>Abb. 3.3</b> | Enterohämolyseverhalten von SF O157:H <sup>-</sup> sowie Positiv- und Negativkontrolle. .... | 24 |
| <b>Abb. 4.1</b> | Hypothesen zur Entstehung der zwei Plasmidgruppen von SF O157:H <sup>-</sup> . ....          | 29 |
| <b>Abb. 4.2</b> | Evolutionsmodell des O157:H7 Komplexes. ....   | 31 |

### Tabellen

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tab. 1.1</b> | Unterschiede zwischen SF EHEC O157:H <sup>-</sup> und NSF EHEC O157:H7/H <sup>-</sup> . .... | 8  |
| <b>Tab. 2.1</b> | In dieser Arbeit verwendete Primer. ....   | 14 |
| <b>Tab. 2.2</b> | In dieser Arbeit verwendete PCR-Bedingungen. ....  | 16 |
| <b>Tab. 2.3</b> | Cycler-Programme für die Sequenzierung. ....   | 19 |
| <b>Tab. 3.1</b> | Genmuster der untersuchten SF O157:H <sup>-</sup> und NSF O157:H7/H <sup>-</sup> . ....      | 22 |

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht in der hier vorliegenden Form gelungen wäre.

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Karch und PD Dr. Alexander W. Friedrich für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die Möglichkeit, die ausgezeichnete Ausstattung und die Mittel des Instituts zur Bearbeitung der Fragestellung nutzen zu können, und für die anregenden Diskussionen, die die Arbeit vorangetrieben haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Ursula Keckevoet und Andrea Lagemann, die mir die Arbeit im Labor durch nützliche Tipps und stetige Unterstützung bei methodischen Fragen und Problemen wesentlich erleichtert haben. Natürlich sei auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts gedankt, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Meiner Freundin Cosima Schwöppe danke ich für die Liebe und Geduld während meines gesamten Studiums und den teilweise sehr stressigen Phasen dieser Arbeit, in denen ich stets auf ein liebevolles zu Hause und Geborgenheit vertrauen konnte.

Abschließend möchte ich mich auch bei allen Freunden und Verwandten bedanken, die mich in meiner unmittelbaren Umgebung die ganze Zeit über immer wieder unterstützt und motiviert haben.

Münster, im November 2006



## 9 Lebenslauf

### **KAI MAARTEN KUHL**

---

Geburtsdatum und -ort      2.3.1980 in Essen  
Nationalität                    deutsch/niederländisch  
Familienstand                 ledig

### **SCHULAUSSBILDUNG**

---

1986 - 1990                    Altstädter Grundschule, Osnabrück  
1990 - 1992                    Orientierungsstufe Innenstadt, Osnabrück  
1992 - 1996                    Ratsgymnasium, Osnabrück  
1996 - 1997                    D.D. Eisenhower High School, Blue Island, IL, USA  
1997 - 1999                    Ratsgymnasium, Osnabrück

### **ZIVILDienst**

---

Aug. 1999 - Juli 2000        Pflegehelfer, Franziskus Hospital Harderberg

### **HOCHSCHULAUSSBILDUNG**

---

Okt. 2000 - Sept. 2003        Studium der Humanmedizin an der WWU Münster  
Sept. 2003 - Feb. 2004        Auslandssemester an der Universiteit Utrecht  
März 2004 - Okt. 2006        Studium der Humanmedizin an der WWU Münster

Sept. 2002                    Ärztliche Vorprüfung  
Sept. 2003                    Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Sept. 2005                    Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Okt. 2006                    Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Okt. 2006                    Approbation als Arzt

Münster, 10.04.2007

## Anhang

Tab. A Stammauswahl und Synopsis der Ergebnisse

| Stamm Nr./<br>Jahr der<br>Isolation | Serotyp | Erkrankung | SF | PCR<br><i>traM</i> | PCR<br><i>sfpA</i> | PCR<br><i>stcE</i> | PCR<br><i>wabB</i> | PCR<br><i>etpD</i> | PCR<br><i>E-hlyA</i> | <i>stx</i><br>Genotyp                              |
|-------------------------------------|---------|------------|----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--|
| <b>NSF O157:H7/H Stämme</b>         |         |            |    |                    |                    |                    |                    |                    |                      |  |
| 512-36/87                           | O157:H7 | HC         | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>  |
| H631/88                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2c</sub>                           |
| H671/89                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| <b>93-36/89</b>                     | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>1</sub>                            |
| Wü3268/90                           | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>  |
| H257/91                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| H416/91                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 5288/91                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>  |
| 6983/91                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2c</sub>                           |
| H903-36/92                          | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 9-36/92                             | O157:H7 | n.b.       | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| H1194/93                            | O157:H7 | asymp.     | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| Wü3658/93                           | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2c</sub>                           |
| 6702/94                             | O157:H7 | n.b.       | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | -                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> , r. <i>stx</i> -          |
| 4605/95                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 4660/95                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 2723/95                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 3232/96                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 4366/96                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| <b>4391/96</b>                      | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>  |
| 4597/96                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 6334/96                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 6831/96                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 4598/97                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 6468/97                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 2085/98                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 2857/98                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 3205/98                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 0865/99                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 1867/99                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 4544/99                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 2483/00                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 4734/00                             | O157:H7 | D          | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 0025/01                             | O157:H7 | LM         | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 0205/01                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 0279/02                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| Wü4444/92                           | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 0846/02                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 0093/03                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2c</sub>                           |
| 0095/03                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2c</sub>                           |
| <b>0144/03</b>                      | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 0171/03                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                            |
| 0187/03                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |
| 0261/03                             | O157:H7 | HUS        | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub> + <i>stx</i> <sub>2c</sub> |

| Stamm Nr./<br>Jahr der<br>Isolation | Serotyp             | Erkrankung | SF | PCR<br><i>traM</i> | PCR<br><i>sfpA</i> | PCR<br><i>stcE</i> | PCR<br><i>wabB</i> | PCR<br><i>etpD</i> | PCR<br><i>E-hlyA</i> | <i>stx</i><br>Genotyp                             |
|-------------------------------------|---------------------|------------|----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|---|
| <b>SF O157:H<sup>-</sup> Stämme</b> |                     |            |    |                    |                    |                    |                    |                    |                      |   |
| 0493/89                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| H210/89                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sup>-</sup>                           |
| H629/91                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sup>-</sup>                           |
| <b>Wü4991/92</b>                    | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 4756/93Kist                         | O157:H <sup>-</sup> | n.b.       | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| Wü3112/93                           | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 3355/93                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 4162/94                             | O157:H <sup>-</sup> | D          | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 221/95                              | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0296/96                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 1533/96                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 2471/96                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 3072/96                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 5869/96                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 15998/96                            | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 340/97                              | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| <b>4180/97</b>                      | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 1528/97                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 3573/98                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 4368/98                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 258/98SM1                           | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 269/98B3                            | O157:H <sup>-</sup> | D          | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 2584/99                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 5376/99                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0301/00                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 2518/00                             | O157:H <sup>-</sup> | asyp.      | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0145/01                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0164/01                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0410/01                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 2841/01                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0679/02                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0817/02                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0852/02                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 02/E149                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0001/03                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| <b>0023/03</b>                      | O157:H <sup>-</sup> | asyp.      | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0088/03                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0094/03                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0100/03                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0198/03                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| 0200/03                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |
| <b>Kontrollstämme</b>               |                     |            |    |                    |                    |                    |                    |                    |                      |   |
| EDL933                              | O157:H7             | LM         | -  | -                  | -                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub> |
| C600 (K-)                           | ND                  |            | +  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                  | -                    | <i>stx</i> <sup>-</sup>                           |
| 3072/96                             | O157:H <sup>-</sup> | HUS        | +  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                  | +                    | <i>stx</i> <sub>2</sub>                           |

Bei den fettgedruckten Stämmen wurden die Gene ansequenziert.

**Tab. B Sequenzierungsergebnisse und Vergleich mit EDL933 bzw. 3072/96**

| Sonde                           | Stamm    | amplifizierte bzw. sequenzierte Produktgröße in bp | analyisierte Länge in bp (Bereich auf Referenzplasmid) | Homologie zum Referenzstamm |
|---------------------------------|----------|--|--|-----------------------------|
| <i>etpD</i>                     | 0023/03  | 1062   | 950 (27510-28459)                                      | 100%*                       |
| <i>etpD</i>                     | 0144/03  | 1062   | 945 (27515-28459)                                      | 100%*                       |
| <i>etpD</i>                     | 4180/97  | 1062   | 945 (27515-28459)                                      | 100%*                       |
| <i>etpD</i>                     | 4391/96  | 1062   | 945 (27515-28459)                                      | 100%*                       |
| <i>etpD</i>                     | 4991/92  | 1062   | 946 (27514-28459)                                      | 100%*                       |
| <i>etpD</i>                     | 93-36/89 | 1062   | 955 (27514-28461)                                      | 100%*                       |
| <i>wabB</i><br>(= <i>rfbU</i> ) | 0023/03  | 917  | 816 (18386-19202)                                      | 99%*<br>Deletion (19186/7)  |
| <i>wabB</i><br>(= <i>rfbU</i> ) | 0144/03  | 917  | 818 (18384-19202)                                      | 99%*<br>Deletion (19186/7)  |
| <i>wabB</i><br>(= <i>rfbU</i> ) | 4180/97  | 917  | 809 (18384-19193)                                      | 99%*<br>Deletion (19186/7)  |
| <i>wabB</i><br>(= <i>rfbU</i> ) | 4391/96  | 917  | 816 (18384-19200)                                      | 99%*<br>Deletion (19186/7)  |
| <i>wabB</i><br>(= <i>rfbU</i> ) | 4991/92  | 917  | 816 (18384-19200)                                      | 99%*<br>Deletion (19186/7)  |
| <i>wabB</i><br>(= <i>rfbU</i> ) | 93-36/89 | 917  | 816 (18384-19200)                                      | 99%*<br>Deletion (19186/7)  |
| <i>stcE</i>                     | 0023/03  | 449  | 387 (23551-23937)                                      | 100%*                       |
| <i>stcE</i>                     | 0144/03  | 449  | 379 (23559-23937)                                      | 100%*                       |
| <i>stcE</i>                     | 4180/97  | 449  | 387 (23551-23937)                                      | 100%*                       |
| <i>stcE</i>                     | 4391/96  | 449  | 388 (23550-23937)                                      | 100%*                       |
| <i>stcE</i>                     | 4991/92  | 449  | 389 (23550-23938)                                      | 100%*                       |
| <i>stcE</i>                     | 93-36/89 | 449  | 389 (23550-23938)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> fwd              | 0023/03  | 586  | 511 (40149-40659)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> rev              | 0023/03  | 606  | 492 (41054-41545)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> fwd              | 0144/03  | 616  | 554 (40140-40693)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> rev              | 0144/03  | 606  | 522 (41024-41545)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> fwd              | 4180/97  | 601  | 497 (40146-40642)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> rev              | 4180/97  | 618  | 504 (41042-41545)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> fwd              | 4391/96  | 871  | 515 (40146-40660)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> rev              | 4391/96  | 609  | 482 (41064-41545)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> fwd              | 4991/92  | 560  | 469 (40146-40614)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> rev              | 4991/92  | 594  | 445 (41103-41547)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> fwd              | 93-36/89 | 872  | 512 (40149-40660)                                      | 100%*                       |
| E- <i>hlyA</i> rev              | 93-36/89 | 623  | 474 (41064-41537)                                      | 100%*                       |
| <i>sfpA</i>                     | 0023/03  | 440  | 427 (10154-10580)                                      | 100%**                      |
| <i>sfpA</i>                     | 4180/97  | 440  | 428 (10154-10581)                                      | 100%**                      |
| <i>sfpA</i>                     | 4991/92  | 440  | 430 (10154-10583)                                      | 100%**                      |
| <i>traM</i>                     | 0023/03  | 159  | 159 (89032-89190)                                      | 100%**                      |
| <i>traM</i>                     | 4180/97  | 159  | 147 (89032-89178)                                      | 100%**                      |
| <i>traM</i>                     | 4991/92  | 159  | 156 (89032-89187)                                      | 100%**                      |

\**Escherichia coli* O157:H7 EDL933, Plasmid pO157, Acc. No. AF074613

\*\**Escherichia coli* O157:H 3072/96, Plasmid pSFO157, Acc. No. AF401292