

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

**Untersuchungen**  
**zur Populationsstruktur von enterohämorrhagischen**  
***Escherichia coli* der Serogruppe O111**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster

vorgelegt von Meng, Natalia  
aus Perm, RSFSR  
2006

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

Dekan: Univ. – Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ. – Prof. Dr. rer. nat. H. Karch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ch. von Eiff

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
Direktor: Univ. – Prof. Dr. rer. nat. H. Karch  
Referent: Univ. – Prof. Dr. rer. nat. H. Karch  
Koreferent: Prof. Dr. med. Ch. von Eiff

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Untersuchungen zur Populationsstruktur von enterohämorrhagischen  
*Escherichia coli* der Serogruppe O111  
Meng Natalia

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) der Serogruppe O111 werden weltweit zunehmend als Erreger von Enteritiden, hämorrhagischer Colitis und hämolytisch – urämisches Syndrom identifiziert. Die schnelle und sichere Isolierung von EHEC – Stämmen aus Stuhlproben von Patienten ist erforderlich, um die klinische Diagnose zu stellen und um die Infektionsquellen und Übertragungswege aufzuklären. Die Populationsstruktur von EHEC O111 ist noch weitgehend unbekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine phänotypische und genotypische Charakterisierung dieser wichtigen Krankheitserreger durchgeführt. Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von 22 EHEC O111 auf Sorbit – MacConkey – Agar (SMAC) und Enterohämolysin – Agar überprüft. Hierbei zeigte sich, dass 81,8% der Stämme Sorbit fermentierten. Bis auf eine Ausnahme verursachten die EHEC O111 auf Enterohämolysin – Agar eine Hämolyse, die durch kleine trübe Hämolysehöfe gekennzeichnet war. Das für den enterohämolytischen Phänotyp verantwortliche EHEC – *hlyA* – Gen konnte bei 21 der 22 EHEC O111 nachgewiesen werden. Da 20 der 22 EHEC O111 unbeweglich waren wurde überprüft, ob das für das H – Antigen kodierende *fliC* – Gen vorhanden war. Die Ergebnisse unserer Analysen zeigten, dass alle 22 EHEC O111 das *fliC* – Gen beherbergten. Für die Einordnung von unbeweglichen EHEC O111 konnte die auf der Restriktionsenzymanalyse und DNA – Sequenz basierende *fliC* – Typisierung erfolgreich durchgeführt werden. Alle unbeweglichen EHEC O111 besaßen das für das H8 – Antigen kodierende *fliC* – Gen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass alle 22 EHEC O111 das *stx1* – Gen besitzen. Dies lag entweder alleine (15 Stämme) oder zusammen mit dem *stx2* – Gen (7 Stämme) vor. Das *eae* – Gen wurde bei 20 der 22 EHEC O111 nachgewiesen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass EHEC O111, obwohl sie in der Regel unbeweglich sind, ein für das H8 – Antigen kodierendes *fliC* – Gen besitzen. Diese Eigenschaft kann für epidemiologische Untersuchungen genutzt werden. Das Vorkommen des *stx1* – Gens scheint charakteristisch zu sein, ebenso die Expression zusätzlicher Pathogenitätsfaktoren (Intimin, EHEC – Hämolysin). Diese Eigenschaften könnten für die hohe Virulenz der EHEC O111 verantwortlich sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2006

**Für meinen Ehemann und meine Eltern**

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>eae</i>	EHEC attaching and effacing – Gen
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
<i>EHEC – hly</i>	EHEC – Hämolysin – Gen
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
<i>fliC</i>	Flagellin – Gen
HUS	hämolytisch – urämisches Syndrom
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria – Bertani Medium
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>stx</i>	Shiga Toxin – Gen
Stx	Shiga Toxin
<i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TBE	Tris – Borat – EDTA – Puffer
U	Unit

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Experimentalteil</b>	5
2.1 Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien	5
2.1.1 Geräte	5
2.1.2 Chemikalien	6
2.1.3 Sonstige Materialien	6
2.2 Bioreagenzien	6
2.3 Medien	6
2.4 Bakterienstämme	7
2.5 Methoden	8
2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	8
2.5.2 Restriktionsanalyse zur Bestimmung des <i>fliC</i> – Genotyps	11
2.5.3 Gelelektrophorese	11
2.5.4 Färbung der DNA	12
2.5.5 Herstellung von PCR – Produkten für die Sequenzierung	12
2.5.6 DNA – Sequenzierung	12
2.5.7 Analyse der Sequenzen	12
<b>3. Ergebnisteil</b>	14
3.1 Phänotypische Charakterisierungen der EHEC O111	14
3.1.1 Wachstum von EHEC O111 – Isolaten auf Sorbit – MacConkey – Agar (SMAC)	14
3.1.2 Überprüfung der Hämolysinbildung auf Enterohämolysin – Agar	14
3.2 Genotypische Charakterisierung der EHEC O111	15
3.2.1 Nachweis und Typisierung der <i>fliC</i> – Gene von EHEC O111	17

3.2.2 Nachweis der <i>stx</i> – Gene bei EHEC O111	19
3.2.3 Vorkommen der <i>eae</i> – Gene bei EHEC O111	20
3.2.4 Nachweis der <i>EHEC</i> – <i>hlyA</i> – Gene bei EHEC O111	20
3.3 Nukleotidsequenzanalyse von <i>fliC</i> – kodierenden Genen	21
3.4 Datenbankeintrag	21
<b>4. Diskussion</b>	<b>24</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>28</b>



## 1. Einleitung

*Escherichia coli* ist ein Bewohner des menschlichen und tierischen Darms. Diese fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien spielen eine wichtige Rolle in den symbiotischen Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora.

*E. coli* Stämme zeichnen sich durch eine hohe Variabilität aus (28). Diese Tatsache könnte mit einer bereits sehr langen Periode der Koadaptation zwischen *E. coli* und Primaten zusammenhängen. Neben apathogenen *E. coli* gehören auch die fakultativ pathogenen *E. coli* zur Normalflora des Colons. Insbesondere die fakultativ pathogenen *E. coli* verursachen endogene Infektionen (Harnwege, Wunden, Blutbahn). Allerdings kennt man bei dieser Bakterienspezies auch ein breites Spektrum von darmpathogenen Wirktypen: enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Die Pathogenität dieser Stämme liegt darin begründet, dass bestimmte Faktoren, wie Adhäsine, Invasine und Toxine von diesen gebildet werden, die für diese Pathovare charakteristische Virulenzmuster ausbilden (24, 28, 33).

EHEC sind begeißelte oder unbegeißelte gramnegative Stäbchen, die aufgrund ihrer Antigen – Struktur zu verschiedenen Serovaren gehören. Bei der Mehrzahl der klinischen Isolate sind außer den Shiga Toxinen (Stx) noch andere Pathogenitätsfaktoren nachweisbar (14, 15, 16, 18, 19, 22, 30, 37, 38, 51, 52, 55, 59, 64, 92, 101, 121). Plasmide und Bakteriophagen dienen bei den pathogenen *E. coli* als mobile Träger von Virulenz assoziierten Genen (22, 44, 45, 67, 84, 91, 101, 102, 104, 105, 107, 122). Auch Pathogenitätsinseln sind an der Ausbreitung von Pathogenitätsgenen beteiligt (51, 109, 121, 125). Das bislang einzig bekannte gemeinsame Merkmal aller EHEC ist die Fähigkeit zur Produktion von Stx (85). Diese werden aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung auf Verozellen (transformierte Affennierenepithelzellen) auch als „Verotoxine“ bezeichnet (56, 61). Entsprechend ihrer biologischen Aktivität werden Stx zur Familie der Ribosomen inaktivierenden Proteine gezählt. Stx sind abhängig vom Gewebe extrem potente Zellgifte. Die bifunktionellen Holotoxine bestehen

aus einer A – Untereinheit und fünf B – Untereinheiten. Die B – Untereinheiten vermitteln die Lektin – ähnliche Bindung des Holotoxins an die Glykosphingolipid – Rezeptoren der Zielzellen, in erster Linie das Globotriaosylzeraamid (Gb3) (71). Die Aufnahme in die Zielzelle erfolgt über Clathrin – vermittelte Endozytose. Die A – Untereinheit hydrolysiert einen spezifischen Adenylrest der ribosomalen RNA; dies hat eine sterische Veränderung des Aktionszentrums der Elongationsfaktoren und die Blockierung der Peptidbiosynthese zur Folge (17, 45, 50, 59, 86, 97). Bei den Stx lassen sich serologisch zwei Hauptgruppen unterscheiden, die als Stx1 und Stx2 bezeichnet werden. Zur Stx2 – Familie zählen das klassische Stx2 sowie die als Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f und Stx2g bezeichneten Varianten (35, 36, 39, 53, 68, 83, 95, 103,117). Auch Varianten des Stx1 wurden beschrieben (23, 65, 124). EHEC Stämme können mehr als einen Toxintyp beherbergen (35, 36, 39, 44, 79). Die für Stx – kodierende Gene liegen im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen (44, 45).

In Bezug auf die Pathogenese der Erkrankung und die klinische Präsentation lassen sich zwei Phasen unterscheiden. Die enterale Infektion wird durch die hohe Säureresistenz der EHEC begünstigt (34). Die EHEC Bakterien besitzen im Gegensatz zu Salmonellen und Shigellen keine invasiven Eigenschaften und werden deshalb nur extrem selten in Blutkulturen nachgewiesen. Etwa eine Woche nach Beginn der enteralen Symptomatik können extraintestinale Komplikationen wie das hämolytisch – urämische Syndrom (HUS) auftreten (4, 5, 6, 7, 20, 21, 25, 27, 29, 40, 41, 58, 64, 72, 93, 99, 106, 110, 115). Dem pathogenetischen Geschehen liegt nach der derzeit gängigen Vorstellung eine Schädigung des Endothels durch die Stx zugrunde, wobei die schwersten Veränderungen im renalen Gefäßendothel gefunden werden (75). Die sich an der Endothelschädigung bildenden Mikrothromben führen vermutlich zur Mikroangiopathie mit konsekutiver Hämolyse und Thrombozytopenie. Nach einer parazellulären Translokation binden Stx an Granulozyten und werden von diesen aus dem Darm über die Blutbahn zu den glomerulären Endothelzellen transportiert (111, 112, 113).

Ein Merkmal zahlreicher EHEC Stämme ist die Bildung so genannter „Attaching and Effacing“ – Läsionen an Enterozyten (121). Die für die Ausbildung der charakteristischen „Attaching and Effacing“ – Läsionen verantwortliche genetische Information liegt auf einer als LEE (Locus of Enterocyte Effacement) bezeichneten Pathogenitätsinsel im EHEC – Chromosom (59, 94, 110). Das *eae* – Gen kodiert für ein als Intimin bezeichnetes Protein. Neben der Pathogenitätsinsel und den Toxinphagen besitzen die meisten EHEC Stämme große Plasmide (69, 70, 98, 100). Zu den Plasmid – kodierten Virulenzdeterminanten zählt das EHEC – Hämolysin (101).

EHEC verursachen auf Blutagarplatten eine spezielle Hämolyse, die als enterohämolytischer Phänotyp bezeichnet wird (9, 10, 101). Hierbei bilden sich nach 18 – bis 24 – stündiger Bebrütung kleine trübe Hämolysehöfe um die Kolonien (9). Die molekulare Untersuchung dieses Phänomens führte zur Identifizierung des für diesen Phänotyp verantwortlichen Proteins und seiner Gene. Diese sind in einem Operon, dem sogenannten EHEC – Hämolysin – Operon, organisiert und für die Synthese, Aktivierung und den Transport des EHEC – Hämolysins verantwortlich. Das EHEC – Hämolysin ist ein 107 kDa großes Protein, das in Wildtyp – Bakterien sowohl zellassoziiert als auch in geringem Maß zellfrei vorkommt. EHEC – Hämolysin ist ein porenbildendes Zytolysin (101).

Die darmpathogenen *E. coli* haben auch eine unterschiedliche Epidemiologie. Neben dem Serotyp O157:H7 werden heute auch andere Serotypen, sogenannte non – O157 EHEC, in steigendem Maße bei Infektionen des Menschen beobachtet, besonders die Serotypen O26:H11, O111:H8/H<sup>-</sup>, O103:H2 und O145:H25/H28/H<sup>-</sup>. EHEC besitzen eine hohe Infektiosität. Als wichtigste Übertragungswege gelten rohe Lebensmittel, kontaminiertes Wasser, Tierkontakte und Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch (1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 12, 24, 31, 47, 48, 49, 60, 62, 76, 77, 78, 80, 81, 87, 89, 90, 100, 114). Wiederkäuer, aber auch andere Tiere gelten als natürliches Reservoir der EHEC (11, 13, 26, 42, 43, 46, 66, 118).

Die Behandlung der EHEC – Infektion kann nur symptomatisch durchgeführt werden und erfordert bei HUS Intensivtherapie und Dialyse (110). Impfstoffe zur Prävention der EHEC – Infektion stehen bis heute nicht zur Verfügung. Die Gabe von Antibiotika ist wegen der dadurch vermehrten Freisetzung von Toxinen kontraindiziert (120).

Durch die Bestimmung der O – und H – Antigene wurde ein System der Subdifferenzierung entwickelt, welches als Serotypie bezeichnet wird. Als Serotyp wird der durch die Identifizierung des O – Antigens bzw. des H – Antigens mittels Antiseren gekennzeichnete Stamm bezeichnet. Die Serotypie stellt aufgrund des umfangreichen Polymorphismus der O – und H – Antigene auch heute noch eine grundlegende Methode dar. Das H – Antigen besteht aus der Flagelle, die aus einem einzigen Protein, dem Flagellin zusammengesetzt ist. Dieses wird durch das *fliC* – Gen kodiert (82).

EHEC O111 ist häufig mit Enteritiden, hämorrhagischer Colitis und hämolytisch – urämischem Syndrom assoziiert (54, 58, 69). Über die Virulenzfaktoren dieser Krankheitserreger ist noch relativ wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, eine Untersuchung zur Populationsstruktur von EHEC O111 – Stämmen durchzuführen. Für diese Untersuchung sollten Patientenisolate verwendet werden.

## 2. Experimentaltteil

### 2.1 Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Brutschränke	Heraeus, Hanau, verschiedene Modelle
Elektrophoresekammern	BioRad, München, mini – Protean – II – Dual Slab
Elektrophorese – Netzteile	BioRad, München, Modelle 3000Xi, 300, Biometra, Göttingen, Modelle P23, P24
Foto – Dokumentationsanlage	Intas, Göttingen, Micro – Cam 3000
Heizplatte	MR 3001,heidolph instruments
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main, Micromat
pH – Meter	Schott, Labor – pH – Meter CG842
Schüttel – Inkubator	B. Braun, Melsungen, Certomat R/H
Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl – Genkingen
Thermocycler	T Personal, Whatman Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, comfort
Tischinkubator	Eppendorf, Hamburg, Thermostat 5320
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5417 R
UV – DNA – Linker	UVP CL – 1000, Crosslinker
Vortexer	Merck, Darmstadt, Modell Test Tube Shaker MELB1719
Waagen	Ohaus, Scout II
Wipp – Schüttler	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Modell 348/1
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg 5404 R

### 2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht abweichend vermerkt, in p.A. – Qualität von den Firmen Biomol GmbH (Hamburg), Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main), peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma – ARK GmbH (Darmstadt) bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt.

Agarose Seakem ME	Biozym, Hess. Oldendorf
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	BioRad, Hercules (CA/USA)

### 2.1.3 Sonstige Materialien

Mikropipetten 20, 100 und 1000µl	Eppendorf, Hamburg: Modell Research
96er Mikrotitrierplatten	Nunc GmbH, Wiesbaden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.2 Bioreagenzien

dNTP – Mix	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
1 kb DNA – Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Restriktionsenzym <i>HhaI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
<i>Taq</i> DNA Polymerase	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

### 2.3 Medien

LB – Flüssigmedium:

Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)

NaCl 1% (w/v)

Der pH – Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7,5 eingestellt.

Sorbit – MacConkey – Agar (SMAC):

Pepton 2% (w/v)

Sorbit 1% (w/v)

Gallensalze Nr.3 0,15% (w/v)

Natriumchlorid 0,5% (w/v)

Neutralrot 0,003% (w/v)

Kristallviolett 0,0001% (w/v)

Agar 1,5% (w/v)

Der pH – Wert des Mediums lag bei 7,2.

## 2.4 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 22 EHEC O111 – Stämme untersucht. Sie wurden aus Stuhlproben von Patienten mit Enteritiden, hämolytisch – urämischen Syndrom und asymptomatischen Trägern isoliert und von Herrn Professor Karch zur Verfügung gestellt (Tabelle 1). Dazu kommen als *E. coli* Referenzstämme Ap320c (O2:H8) und Bi7455–41 (O43:H2). Die Stämme wurden aus den Stammkulturen auf Sorbit – MacConkey – Agar ausgestrichen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

**Tabelle 1: Charakteristika der verwendeten EHEC O111 – Stämme**

Stamm – Nummer	Klinik
6037/96	HUS
3997/98	HUS
3385/00	HUS
2516/00	HUS
1187/00	HUS
4725/00	HUS
6366/97	HUS
0002/86	HUS
1639/77	unbekannt
ED82/98	unbekannt
ED47	unbekannt
5380/96	Enteritis
5727/96	Enteritis
5721/96	Enteritis
3732/97	Enteritis
4796/97	asymptomatisch
4794/97	asymptomatisch
4791/97	asymptomatisch
5556/97	Enteritis
3648/98	Enteritis
4556/99	unbekannt
4417/96	HUS

## 2.5 Methoden

### 2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um das Vorhandensein eines Gens im Genom eines Stammes nachzuweisen, wurden verschiedene PCR – Verfahren durchgeführt. Dabei ist von folgendem Standardansatz ausgegangen worden. Als DNA Template wurde die Suspension einer einzelnen, auf einem Nährboden frisch angezüchteten Kolonie in 50 µl 0,9%iger Saline eingesetzt. Für eine Reaktion wurden in ein 0,2 µl PCR – Reaktionsgefäß folgende Reagenzien pipettiert:



Gesamtansatz Mastermix: 50µl	
10x Reaktionspuffer Y(peqlab)	5 µl
5x Enhancer Solution P(peqlab)	10 µl
dNTP – Mix (10mM Stammlösung, peqlab)	1 µl
Upstream Primer (aus 30mM Stammlösung, Sigma – ARK)	1 µl
Downstream Primer (aus 30mM Stammlösung, Sigma – ARK)	1 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase unverdünnt (250 units/µl) (peqlab)	0,25 µl
DNA – Template:	
Bakteriensuspension	5 µl
Aqua dest.	auf 50 µl auffüllen.

Die PCR – Primer und PCR – Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotid – Primerpaare mit Angabe des nachzuweisenden Gens, der Primerbezeichnung, der Sequenz, der Länge des Amplifikats und der Literaturquelle**

Primer – Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Gen	Bedingungen für die PCR – Reaktionen			Größe des Amplifikats [bp]	Literatur- quelle
			Denaturierung	Anlagerung	Extension		
KS7	CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC	<i>stx1</i>	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 40 s	258	35
KS8	CCC GAA TTC AGC TAT GAG TCA ACG						
GK3	ATG AAG AAG ATG TTT ATG	<i>stx2 stx2c</i>	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 40 s	260	35
GK4	TCA GTC ATT ATT AAA CTG						
HlyA1	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G	<i>EHEC – hlyA</i>	94°C, 30 s	57°C, 60 s	72°C, 90 s	1550	101
HlyA4	TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A						
SK1	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC	<i>eae</i>	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 60 s	863	102
SK2	CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G						
fliC 1	CAA GTC ATT AAT ACM AAC AGC C	<i>fliC</i>	94°C, 30 s	53°C, 60 s	72°C, 120 s	900 – 2600	107
fliC 2	GAC ATR TTR GAV ACT TCS GT						

### 2.5.2 Restriktionsanalyse zur Bestimmung des *fliC* – Genotyps

Die Differenzierung der verschiedenen *fliC* – Genotypvarianten erfolgte mittels Restriktionsverdau. Hierzu wurden die PCR – Amplifikate durch die Restriktionsendonuklease *HhaI* geschnitten. Zur Spaltung der Amplifikate wurden jeweils 15 µl extrahierte DNA mit 1 µl *HhaI* und 2 µl des zugehörigen Reaktionspuffers in Gegenwart von 2 µl 10 – fach konzentriertem BSA in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdaut.

Der Ansatz wurde nach kurzem Zentrifugieren für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte der Auftrag auf ein 2% iges Agarosegel in einer Elektrophoresekammer.

### 2.5.3 Gelelektrophorese

Die PCR – Amplifikate wurden vor der Restriktionsspaltung mittels Elektrophorese hinsichtlich Qualität und Quantität kontrolliert, wofür Gele mit 1,5% bzw. 2% Agarose hergestellt wurden. Die jeweilige Menge an Agarose wurde in 0,5fachem TBE – Puffer aufgekocht und gegossen. Die zu kontrollierenden Ansätze wurden mit 10facher DNA – Probenpuffer versetzt und in die Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 1,5 V/cm<sup>2</sup> Gel durchgeführt.

10x TBE – Puffer:

Tris Ultra	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	25 mM

DNA – Probenpuffer (10fach):

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

#### **2.5.4 Färbung der DNA**

Nach dem Erreichen der gewünschten Wanderungstrecken, die anhand mitwandernder Farbstoffe des Ladepuffers abgeschätzt wurden, wurde das Gel entnommen und für 20 – 30 Minuten in eine Färbelösung (Ethidiumbromid) gelegt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Waschen in Aqua dest. für 10 Minuten entfernt. Anschließend wurden die entstandenen Komplexe aus Ethidiumbromid und DNA als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

#### **2.5.5 Herstellung von PCR – Produkten für die Sequenzierung**

Die *fliC* – Gene der zwei EHEC O111 – Stämme (Stamm – Nummer: 3385/00 und 5721/96) wurden mit Hilfe der in der Tabelle 3 aufgeführten Primer amplifiziert. Danach wurden die PCR – Produkte mittels des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

#### **2.5.6 DNA – Sequenzierung**

Zur Sequenzierung wurde der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit eingesetzt. Er enthält folgende Komponenten:

Terminator – Prämix:

Dye – Terminatoren (A, C, G, T)

dATP, dCTP, dTTP, dITP

Tris/HCl pH 9,0

MgCl<sub>2</sub>

thermostabile Pyrophosphatase

*Taq* DNA Polymerase

#### **2.5.7 Analyse der Sequenzen**

Die Sequenzanalysen wurde mit der DNAsis – Software (Version 2.0, Hitachi – Software) und dem Internetprogramm NCBI Blast durchgeführt.

**Tabelle 3: PCR – Primer zur Sequenzanalyse von *fliC* – Genen**

Primer	Primer – Sequenz (5' – 3')	PCR – Bedingungen		
		Denaturierung	Anlagerung	Extension
fliC	CAA GTC ATT AAT ACM AAC AGC C	94°C, 30 s	53°C, 60 s, 30 Zyklen	72°C, 120 s
fliC2	GAC ATR TTR GAV ACT TCS GT	94°C, 30 s	53°C, 60 s 30 Zyklen	72°C, 120 s
NW-H8-1	GGT TGG TGC TAA TGA TGG TG	96°C, 10 s	57°C, 15 s 24 Zyklen	60°C, 4 min
NW-H8-2	AGA AAG TTC ACG AAT ACG C	96°C, 10 s	51°C, 15 s 24 Zyklen	60°C, 4 min
NW-H8-3	TTG CGG CTT TAT TTT CCA C	96°C, 10 s	57°C, 15 s 24 Zyklen	60°C, 4 min
NW-H8-4	AAT CTA CCA CCA ACC CGC TC	96°C, 10 s	60°C, 15 s 24 Zyklen	60°C, 4 min
NW-H2-1	AAA CGA CGG CGA AAC AAT	96°C, 10 s	56°C, 15 s 24 Zyklen	60°C, 4 min
NW-H2-3	AAA CGA CGG CGA AAC AAT	96°C, 10 s	54°C, 15 s 24 Zyklen	60°C, 4 min
NW-H2-4	GAT GAC GGT AAA CAG TAT GC	96°C, 10 s	51°C, 15 s 24 Zyklen	60°C, 4 min

### **3. Ergebnisteil**

#### **3.1 Phänotypische Charakterisierungen der EHEC O111**

##### **3.1.1 Wachstum von EHEC O111 – Isolaten auf Sorbit – MacConkey – Agar (SMAC)**

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von 22 EHEC O111 – Stämmen auf Sorbit – MacConkey – Agar (SMAC) und Enterohämolysin – Agar überprüft. Hierbei zeigte sich, dass 18 EHEC O111 – Stämme den Zuckeralkohol Sorbit fermentierten. Die restlichen vier EHEC O111 – Stämme (Stamm – Nummer: 0002/86, 1639/77, ED82/98 und ED47) wurden als nicht – Sorbit fermentierend gekennzeichnet (Tabelle 4).

##### **3.1.2 Überprüfung der Hämolysinbildung auf Enterohämolysin – Agar**

Bis auf eine Ausnahme (Stamm – Nummer: 1639/77) verursachten die EHEC O111 – Stämme auf Enterohämolysin – Agar eine Hämolyse, die durch kleine trübe Hämolysehöfe gekennzeichnet war (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Hämolytischer Phänotyp und Sorbit – Fermentation von EHEC O111 – Stämmen**

Stamm – Nummer	Enterohämolytischer Phänotyp	Sorbit – Fermentation
6037/96	+	+
3997/98	+	+
3385/00	+	+
2516/00	+	+
1187/00	+	+
4725/00	+	+
6366/97	+	+
0002/86	+	-
1639/77	-	-
ED82/98	+	-
ED47	+	-
5380/96	+	+
5727/96	+	+
5721/96	+	+
3732/97	+	+
4796/97	+	+
4794/97	+	+
4791/97	+	+
5556/97	+	+
3648/98	+	+
4556/99	+	+
4417/96	+	+

+ = Hämolyse bzw. Sorbit – Fermentation innerhalb von 24 Std.

- = keine Hämolyse bzw. Sorbit – Fermentation.

### 3.2 Genotypische Charakterisierung der EHEC O111

Die Ergebnisse der PCR – Analysen zum Nachweis potentieller Virulenzgene sind in der Tabelle 5 zusammengefasst und werden im Folgenden weiter erläutert.

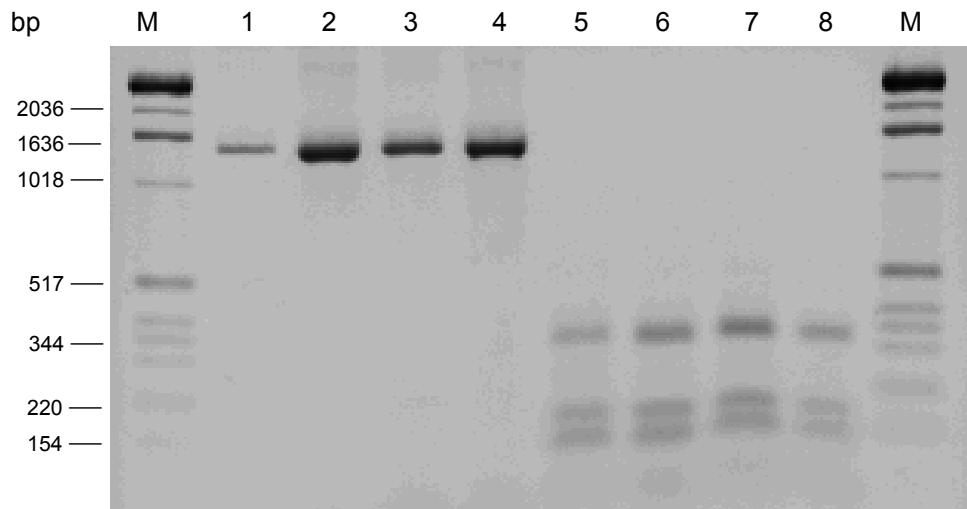
**Tabelle 5: PCR – Analysen von EHEC O111 – Stämmen zum Nachweis potentieller Virulenzgene**

EHEC O111 – Stämme							
Stamm - Nummer	Serotyp (Objektträger- Agglutination)	Genotyp					
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>	<i>eae</i>	<i>EHEC - hlyA</i>	<i>fliC</i>
6037/96	O111:H <sup>-</sup>	+	+	-	+	+	H8
3997/98	O111:H <sup>-</sup>	+	+	-	+	+	H8
3385/00	O111:H <sup>-</sup>	+	+	-	+	+	H8
2516/00	O111:H <sup>-</sup>	+	+	-	+	+	H8
1187/00	O111:H <sup>-</sup>	+	+	-	-	+	H8
4725/00	O111:H <sup>-</sup>	+	+	-	+	+	H8
6366/97	O111:H <sup>-</sup>	+	+	-	+	+	H8
0002/86	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
1639/77	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	-	H8
ED82/98	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
ED47	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	-	+	H8
5380/96	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
5727/96	O111:H2	+	-	-	+	+	H8
5721/96	O111:H2	+	-	-	+	+	H8
3732/97	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
4796/97	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
4794/97	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
4791/97	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
5556/97	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
3648/98	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
4556/99	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8
4417/96	O111:H <sup>-</sup>	+	-	-	+	+	H8

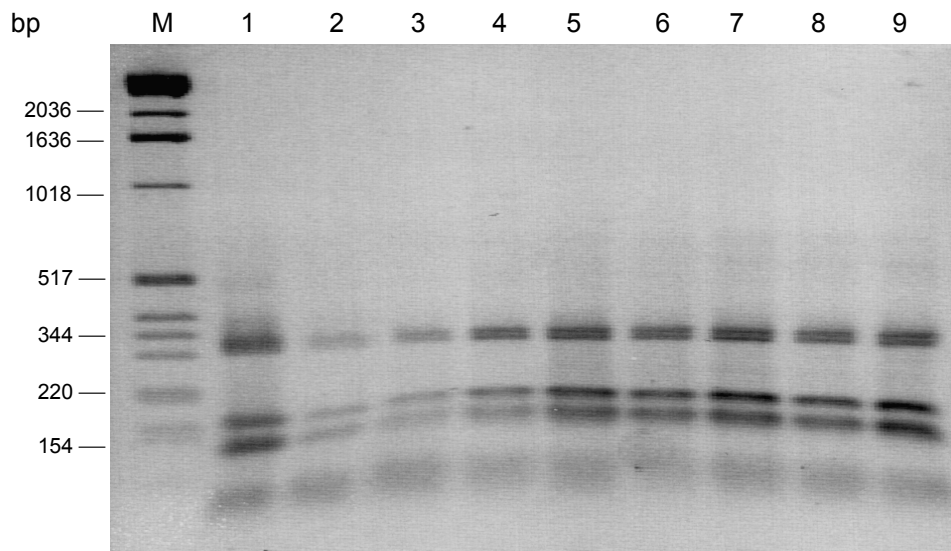


### 3.2.1 Nachweis und Typisierung der *fliC* – Gene von EHEC O111

Da 20 der 22 EHEC O111 – Stämme unbeweglich waren, wurde überprüft, ob das für das H – Antigen kodierende *fliC* – Gen vorhanden war. Für die Einordnung von unbeweglichen EHEC O111 – Isolaten konnte die auf der Restriktionsenzymanalyse und DNA – Sequenz basierende *fliC* – Typisierung erfolgreich durchgeführt werden. Hierzu wurden die Primer *fliC1* und *fliC2* verwendet (Tabelle 2). Die Spaltung in vier nahezu identische DNA – Fragmente der *fliC* – Amplifikationsprodukte erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *HhaI* (Abbildung 1 und 2). Die *fliC* – Analysen mit den beiden *E. coli* Referenzstämmen Ap320c (O2:H8) und Bi7455–41 (O43:H2) ergaben eindeutig unterschiedliche Restriktionsmuster. Der *E. coli* Referenzstamm Ap320c hingegen zeigte ein identisches Restriktionsmuster wie die hier untersuchten 22 EHEC O111. Aufgrund des typischen *HhaI* – Restriktionsmusters und der Nukleotidsequenz der *fliC* – Amplifikate konnten alle EHEC O111 dem H8 – Genotyp zugeordnet werden. Dies deutet darauf hin, dass alle 22 untersuchten EHEC O111 – Stämme das für das H8 – Antigen kodierende *fliC* – Gen beherbergen (Abbildung 1 und 2).



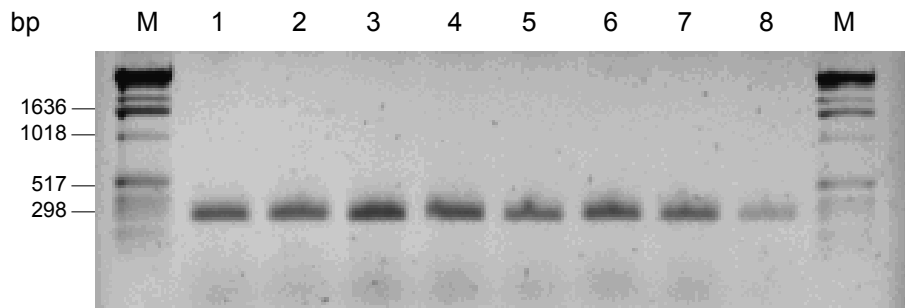
**Abbildung 1: Agarosegelelektrophorese der Amplifikate (Spur 1 – 4). Restriktionsenzymanalyse (Spur 5 – 8) von *fliC* – Genen aus EHEC O111.**  
 Spuren: M=1kb DNA-Marker, 1=6366/97, 2=2516/00, 3=5721/96, 4=3385/00, 5=6366/97, 6=2516/00, 7=5721/96, 8=3385/00.



**Abbildung 2: Agarosegelelektrophorese der Restriktionsenzymanalyse (Spur 1 – 9) von *fliC* – Genen aus EHEC O111.**  
 Spuren: M=1kb DNA-Marker, 1=6037/96, 2=3997/98, 3=1639/77, 4=3732/97, 5=5556/97, 6=4417/96, 7=4791/97, 8=5727/96, 9=ED47.

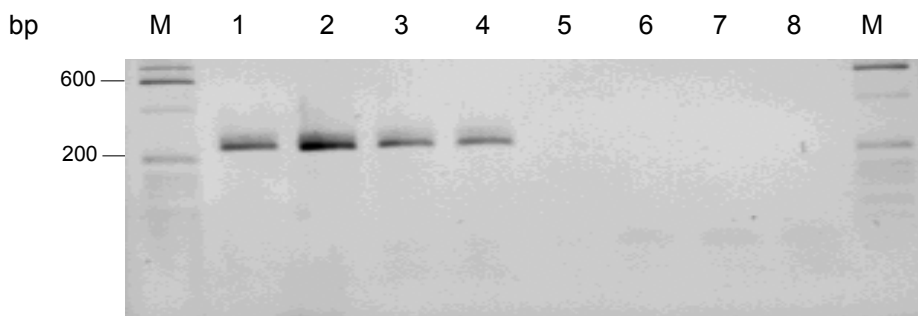
### 3.2.2 Nachweis der *stx* – Gene bei EHEC O111

Zum Nachweis der *stx* – Gene wurde eine PCR – Analyse unter Verwendung der Primerpaare KS7 – KS8 und GK3 – GK4 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass alle 22 EHEC O111 – Stämme das *stx1* – Gen besitzen (Abbildung 3). Dies lag entweder alleine (15 Stämme) oder zusammen mit dem *stx2* – Gen (7 Stämme) vor (Abbildung 4). Bei allen 22 EHEC O111 – Isolaten konnten wir keine *stx2c* – Gene nachweisen.



**Abbildung 3: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis von *stx1* – Genen. PCR – Amplifikationsprodukte.**

Spuren: M=1kb DNA-Marker, 1=6037/96, 2=3385/00, 3=2516/00, 4=0002/86, 5=5721/96, 6=4794/97, 7=4791/97, 8=6366/97.

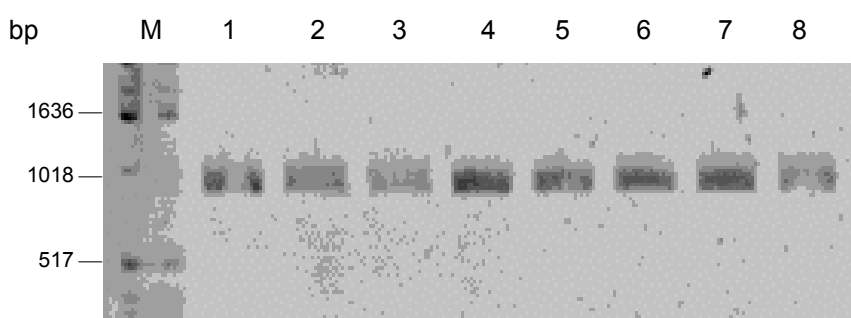


**Abbildung 4: Agarosegelelektrophorese der *stx2* – Gene. PCR – Amplifikationsprodukte.**

Spuren: M=100bp DNA-Marker, 1=6037/96, 2=3385/00, 3=1187/00, 4=6366/97, 5=5721/96, 6=4794/97, 7=5556/97, 8=4556/99.

### 3.2.3 Vorkommen der *eae* – Gene bei EHEC O111

Um zu überprüfen ob und wie häufig das *eae* – Gen bei den EHEC O111 – Stämmen vorkommt, wurde eine PCR mit den Primern SK1 und SK2 durchgeführt (Tabelle 2). Das Intimin – kodierende *eae* – Gen wurde bei 20 der 22 EHEC O111 – Stämmen nachgewiesen (Abbildung 5). Bei 2 Stämmen (Stamm – Nummer: 1187/00 und ED47) konnten wir kein *eae* – Gen identifizieren.



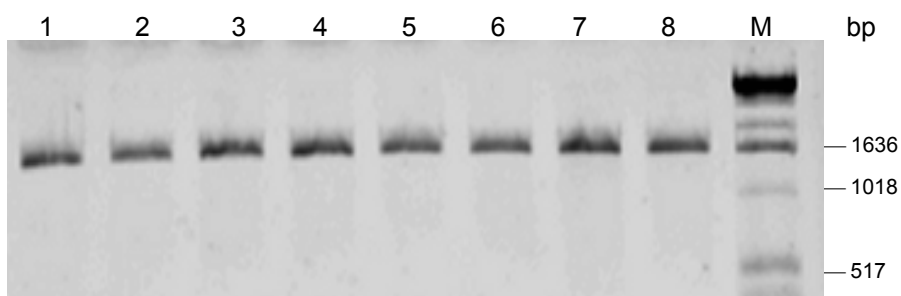
**Abbildung 5: Agarosegelelektrophorese der *eae* – Gene.**

**PCR – Amplifikationsprodukte.**

Spuren: M=1kb DNA-Marker, 1=3385/00, 2=2516/00, 3=4725/00, 4=5721/96, 5=5727/96, 6=4794/97, 7=3648/98, 8=4556/99.

### 3.2.4 Nachweis der *EHEC* – *hlyA* – Gene bei EHEC O111

Das für den enterohämolytischen Phänotyp verantwortliche EHEC – *hlyA* – Gen konnte bei 21 der 22 untersuchten EHEC O111 – Stämmen nachgewiesen werden (Tabelle 2). Lediglich bei einem Isolat (Stamm – Nummer: 1639/77) konnten wir das EHEC – *hlyA* – Gen nicht nachweisen (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Amplifikation mit *EHEC* – *hlyA* – spezifischen Primern.**

Spuren: M=1kb DNA-Marker, 1=6037/96, 2=2516/00, 3=4725/00, 4=5380/96, 5=5721/96, 6=4794/97, 7=5556/97, 8=4556/99.

## 3.3 Nukleotidsequenzanalyse von *fliC* – kodierenden Genen

Von zwei EHEC O111 – Stämmen (Stamm – Nummer: 3385/00 und 5721/96) wurde die Nukleotidsequenz der *fliC* – Gene ermittelt. Die Restriktionsendonuklease *HhaI* schnitt die Aminosäuresequenzen an elf verschiedenen Stellen (Tabelle 6 und Abb. 7).

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der 2 untersuchten *fliC* – getragenden EHEC O111 – Stämme mit der Aminosäuresequenz des *E. coli* Referenzstammes af517661 ergab sich eine Homologie von 98,2% (Tabelle 7). Die Ursache für die bei der Mehrzahl der Stämme beobachtete Unbeweglichkeit konnte durch die Nukleotidsequenzanalyse des *fliC* – Gens nicht geklärt werden. Aus den vorliegenden Sequenzen ergaben sich keine Hinweise auf Deletionen oder Stop – Codons.

**Tabelle 6: Schnittstellen und Fragmentgrößen des *fliC* – Gens nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease *HhaI*. (Analysiert wurden die EHEC O111 – Stämme 5721/96 und 3385/00)**

Schnittstellen [bp]	Fragmentgrößen [bp]
103	103
207	104
225	18
514	289
516	2
619	103
658	39
805	147
904	99
1048	144
1066	18
1371	305

### 3.4 Datenbankeintrag

Die ermittelten Nukleotidsequenzen der *fliC* – Gene der EHEC O111 (Stamm – Nummer: 5721/96 und 3385/00) sind bei der EMBL Datenbank eingegangen und wurden unter den Nummern (accession numbers) AJ567918 bzw. AJ567919 gespeichert.

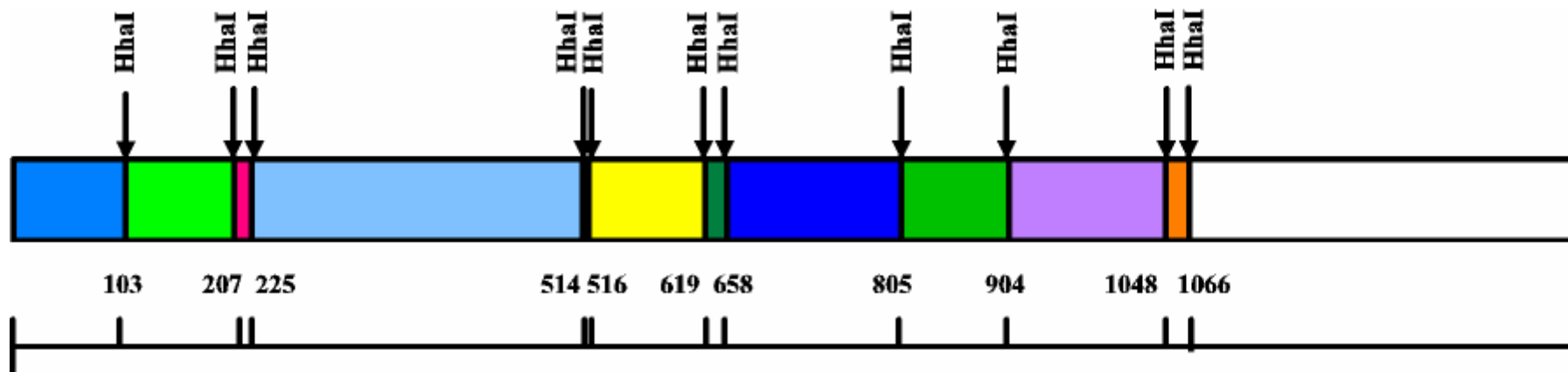


Abbildung 7: Schnittstellen und Fragmentgrößen vom *fliC* – Gen mit der Restriktionsendonuklease *HhaI* von O111:H8 – Isolaten (Stamm – Nummer: 5721/96 und 3385/00).

**Tabelle 7: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *fliC* – Gen – tragenden EHEC O111:H8 – Stämmen 5721/96 und 3385/00 mit den Aminosäuresequenzen des *E. coli* Referenzstamms af517661.**

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
af517661	SQSSLT	SAIE RLSSGLRINS	AKDDAAGQAI	ANRFTANIKG	LTQASRNAND	GISVAQTTEG	ALNEINNNLQ	RIRELSVQAT	NGTNSDSDLS	
5721/96	----- <b>S</b> -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3385/00	----- <b>S</b> -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		100	110	120	130	140	150	160	170	180
af517661	SIQAEITQRL	EEIDRVSEQT	QFNGVKVLAE	NNEMKIQVGA	NDGETITINL	AKIDAKTLGL	DAFNIN <b>GAQK</b>	ATGSDLISKF	KATGTDNYDV	
5721/96	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- <b>D</b> -----	-----	-----	-----
3385/00	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- <b>D</b> -----	-----	-----	-----
		190	200	210	220	230	240	250	260	270
af517661	GGKTYTVNVE	SGAVKNDANK	DVFNVAADGS	LTTSSDTKVS	GESIDATELA	KLAIKLADKG	SIEYKGITFT	NNTGAELDAN	GKGVLTANID	
5721/96	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3385/00	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		280	290	300	310	320	330	340	350	360
af517661	GQDVQFTIDS	<b>D</b> APTGAGATI	TTDTAVYKNS	AGQFTTTKVE	NKAATLSDLD	LNAAKKTGST	LVVNGATYNV	SADGKTVTDT	TPGAPKVMYL	
5721/96	-----	----- <b>N</b> -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3385/00	-----	----- <b>N</b> -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		370	380	390	400	410	420	430	440	443
af517661	SKSEGGSP <b>N</b> L	VNEDAASLQ	<b>F</b> TTNPLETID	KALAKVDNLR	<b>S</b> GLGAVQNR <b>F</b>	<b>D</b> FAITNLGNT	VNNL <b>F</b> SARSR	IEDADYATEV	SNM	
5721/96	----- <b>I</b> -----	-----	----- <b>S</b> -----	-----	----- <b>D</b> -----	----- <b>S</b> -----	----- <b>S</b> -----	-----	-----	8 <u>98,2%</u>
3385/00	----- <b>I</b> -----	-----	----- <b>S</b> -----	-----	----- <b>D</b> -----	----- <b>S</b> -----	----- <b>S</b> -----	-----	-----	8 <u>98,2%</u>

## 4. Diskussion

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) gehören zu den darmpathogenen *E. coli*, die eine hämorrhagische Colitis und das sich extraintestinal manifestierende hämolytisch – urämische Syndrom (HUS) hervorrufen können. Meist werden die Erreger über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen (6, 20, 29, 58). Die klinisch bedeutsamen lebensbedrohlichen Syndrome der EHEC – Infektionen werden meistens durch wenige hochpathogene Varianten hervorgerufen, u.a. durch EHEC O157:H7/H<sup>-</sup>, O26:H11/H<sup>-</sup>, O103:H2/H<sup>-</sup>, O111:H8/H<sup>-</sup> und O145:H25/H28/H<sup>-</sup> (58). Ziel der Arbeit war es, die für die Darmpathogenität von EHEC O111 ursächlichen Virulenzfaktoren zu identifizieren und die Populationsstruktur dieser Krankheitserreger zu analysieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass EHEC O111 – Stämme ein komplexes Virulenzspektrum aufweisen. Dabei konnten wir mehrere an der Virulenz von EHEC O111 beteiligten Gene identifizieren, die bei apathogenen oder wenig virulenten EHEC – Stämmen nicht vorkommen. Hierzu gehören die für die Stx – kodierenden *stx1* – und *stx2* – Gene, das für das Intimin – kodierende *eae* – Gen und das EHEC – *hlyA* – Gen. Damit besitzen EHEC O111 – Stämme neben den Stx noch weitere potentielle Pathogenitätsfaktoren. Das einheitliche Vorkommen eines für das H8 – Antigen kodierenden *fliC* – Gens spricht für eine klonale Populationsstruktur. Die Ursache für die bei der Mehrzahl der Stämme beobachtete Unbeweglichkeit konnte durch die Nukleotidsequenzanalyse des *fliC* – Gens nicht geklärt werden. Wir fanden keine Hinweise auf Deletionen oder Stop – Codons innerhalb des *fliC* - Gens. Bei unbeweglichen EHEC O157 – Isolaten wird die Unbeweglichkeit auf eine 12 bp große Deletion zurückgeführt (82).

Die meisten EHEC Stämme können mit den üblichen kulturellen Verfahren der Stuhldiagnostik nicht erfasst werden (54, 57, 58, 60, 73, 74, 96, 119, 122). Als einzige Ausnahme gelten bisher nur die kulturellen Verfahren zur Erkennung



des EHEC Serotyps O157:H7, die keine Säure aus Sorbit und keine  $\beta$  – D – Glucuronsäure bilden und somit auf bestimmten Selektivnährmedien charakteristisch gefärbte Kolonien bilden. Sorbit – positive EHEC O157:H<sup>-</sup> und zahlreiche andere EHEC – Serovare können durch kulturelle Verfahren nicht erfasst werden (58, 60, 63). Aufgrund ihrer Sorbit – Fermentation gilt dies auch für die Mehrzahl der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten EHEC O111.

Bei allen untersuchten 22 EHEC O111 – Stämmen ließ sich das *stx1* – Gen nachweisen. Dies ist eine Besonderheit, denn bei der Mehrzahl der EHEC anderer Serovare dominiert das *stx2* – Gen (35). Zur Stx2 – Familie zählen das klassische Stx2 sowie die als Stx2c, Stx2d, Stx2e und Stx2f bezeichnete Varianten, wobei von letzteren nur Stx2c und Stx2d in humanpathogenen *E. coli* – Stämmen gefunden wurden (35). EHEC können mehr als einen Toxintyp beherbergen (35, 36, 39). Auch bei sieben der hier untersuchten 22 EHEC O111 wurden neben dem *stx1* – auch *stx2* – Gene nachgewiesen. Die Strukturgene für *stx1* und *stx2* liegen im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen. Die dadurch bedingte Mobilität der *stx* – Gene bietet eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen. Wir vermuten, dass ein *stx1* – Gen – tragender EHEC O111 – Stamm im Verlauf seiner Evolution zusätzlich von einem *stx2* – Gen – kodierenden Bakteriophagen transduziert wurde, so dass in derartigen Stämmen zwei verschiedene *stx* – Gene vorliegen. Diese Hypothese muss allerdings durch weitere Versuche abgesichert werden, bei denen auch die *Stx* – flankierenden Bereiche analysiert werden sollten. Hierdurch könnte geklärt werden, ob die *stx* – Gene im Genom von Bakteriophagen lokalisiert sind.

Für epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Häufigkeit der verschiedenen EHEC ist die Serotypie ein unverzichtbares Element. Allerdings gibt es bei der Spezies *E. coli* eine große biologische Vielfalt an Serotypen. Derzeit sind die O – Antigene 1 – 181 und die H – Antigene 1 – 56 bekannt. Ein weiterer Nachteil der herkömmlichen H – Typisierung ist das Auftreten von Kreuzreaktionen zwischen bestimmten H – Antigenen, die gemeinsame Epitope

teilen. Außerdem sind zahlreiche EHEC – Isolate aufgrund ihrer Unbeweglichkeit nicht mit H – Seren zu typisieren. Dies macht die Ermittlung ihrer H – Antigene unmöglich. Kürzlich wurde eine neue Methode entwickelt die auf einer PCR – Amplifikation des *fliC* – Gens und einer sich anschließenden Restriktionsenzymanalyse beruht (33, 82, 107, 123). Für die Einordnung von unbeweglichen EHEC O111 – Isolaten konnte die auf der Restriktionsenzymanalyse und DNA – Sequenz basierende *fliC* – Typisierung erfolgreich durchgeführt werden. Alle unbeweglichen EHEC O111 – Stämme besaßen das für das H8 – Antigen kodierende *fliC* – Gen. Ein großer Vorteil der *fliC* – Genotypisierung liegt in einem geringen Zeitaufwand. Aus der Sequenzanalyse konnten allerdings keine Hinweise für die Unbeweglichkeit der Stämme abgeleitet werden. Allerdings sind für die Synthese der kompletten Flagellen weitere Gene erforderlich, die hier nicht analysiert wurden. Der komplexe Prozess der Flagellensynthese wird darüber hinaus auch auf der Regulationsebene von zahlreichen bakteriellen Determinanten und Umwelteinflüssen beeinflusst.

Zu einer wirkungsvollen Bekämpfung der EHEC – Erkrankungen gehören die sorgfältige Überwachung der epidemiologischen Situation und die Intervention bei der Übertragung der Erreger (32, 41, 67, 88, 97, 108, 116). Bisher haben nur wenige Länder ein Instrumentarium geschaffen, mit dem sich die Verbreitung von EHEC verfolgen lässt. Ein maßgeblicher Grund hierfür ist, dass bei der Diagnostik von EHEC – Erkrankungen nach wie vor grundsätzliche Probleme bestehen. In Deutschland ist gemäß §§ 6 und 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) das enteropathische HUS und der Nachweis von EHEC meldepflichtig.

Der Nachweis von EHEC erfolgt entweder über die Stx – Bildung oder molekularbiologisch durch den Nachweis der *stx* – Gene (58). Die EHEC Labordiagnostik erfolgt in drei Stufen (58). In der ersten Stufe erfolgt das Screening mittels kommerziell erhältlichen Selektivnährmedien und eines Enzymimmunoassay (EIA), der aus einer Anreicherungskultur durchgeführt

werden sollte. Der Toxinnachweis im EIA bedarf aber zur Bestätigungstests der anschließenden Isolierung und Charakterisierung des Isolats mit erneutem Nachweis seiner Toxinbildung (zweite Stufe). Mit der Stx – Kolonien – Blot – Hybridisierung steht ein leistungsfähiger Serovar – unabhängiger Test zur Isolierung der EHEC kommerziell zur Verfügung. Hierbei werden Stx – positive Kolonien mittels monoklonaler Antikörper, die Stx – spezifisch sind, aus einem heterogenen Keimgemisch identifiziert. In der dritten Stufe erfolgt die Typisierung der Erregerisolate für epidemiologische Zwecke, insbesondere für die Surveillance von EHEC – Infektionen. Bei dieser Feintypisierung der EHEC – Isolate sollte neben der Serotypie auch der Nachweis von Virulenzgenen (*eae*, *EHEC – hlyA*) erfolgen.

Aufgrund des Fehlens einer kausalen Therapie des HUS, der hohen Virulenz und der damit verbundenen hohen Letalität der EHEC, ist das Finden eines Erregerreservoirs und das Aufklären von Infektketten von hoher gesundheitspolitischer Relevanz. Nur auf dieser Grundlage sind präventive Maßnahmen bzw. Interventionen möglich.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H. P., Resch, A., Dierich, M. P., Friedrich, A. W., Karch, H., 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Euro Surveill.* 6, 147-151.
2. Allerberger, F., Friedrich, A. W., Grif, K., Dierich, M. P., Dornbusch, H., Mache, C. J., Nachbaur, E., Freilinger, M., Rieck, P., Wagner, M., Caprioli, A., Karch, H., Zimmerhackl, L. B., 2003. Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int. J. Infect. Dis.* 7, 42-45.
3. Ammon, A., Petersen, L. R., Karch, H., 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H- *J. Infect. Dis.* 179, 1274-1277.
4. Andreoli, S. P., Trachtman, H., Acheson, D. W. K., Siegler, R. L., Obrig, T. G., 2002. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr. Nephrol.* 17, 293-298.
5. Banatvala, N., Griffin, P. M., Greene, K. D., Barrett, T. J., Bibb, W. F., Green, J. H., Wells, J. G., 2001. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J. Infect. Dis.* 183, 1063-1070.
6. Bell, B. P., Goldoft, M., Griffin, P. M., Davis, M. A., Gordon, D. C., Tarr, P. I., Bartleson, C. A., Lewis, J. H., Barrett, T. J., Wells, J. G., 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272, 1349-1353.
7. Bell, B. P., Griffin, P. M., Lozano, P., Christie, D. L., Kobayashi, J. M., Tarr, P. I., 1997. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 100, E12.
8. Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, M. P., Barrett, T. J., Wells, J. G., Griffin, P. M., 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269, 2217-2220.

9. Beutin, L., M. A. Montenegro, I. Ørskov, F. Ørskov, J. Prada, S. Zimmermann, and R. Stephan. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2559-2564.
10. Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., Gleier, K., 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1099-1108.
11. Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Minarikova, H., Jikova, E., Karmali, M. A., Laubova, J., Sikulova, J., Preston, M. A., Khakhria, R., Karch, H., Klazarova, H., Nyc, O., 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol. Infect.* 119, 299-305.
12. Bielaszewska, M., Schmidt, H., Karmali, M. A., Khakhria, R., Janda, J., Blahova, K., Karch, H., 1998. Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H-strains in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2135-2137.
13. Bielaszewska, M., Schmidt, H., Liesegang, A., Prager, R., Rabsch, W., Tschape, H., Cizek, A., Janda, J., Blahova, K., Karch, H., 2000. Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H-strains and a source of human diseases. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3470-3473.
14. Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tschape, H., Schmidt, M. A., Karch, H., 2004. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect. Immun.* 72, 1812-1816.
15. Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczius, T., Karch, H., 2005a. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation and death of human endothelial cells. *Infect. Immun.*, in press.
16. Bielaszewska, M., Tarr, P. I., Karch, H., Zhang, W., Mathys, W., 2005b. Tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and sorbitol-fermenting O157:NM clinical isolates: Phenotypic and molecular

analysis. J. Clin. Microbiol., in press.

17. Bitzan, M. M., Wang, Y., Lin, J., Marsden, P. A., 1998. Verotoxin and ricin have novel effects on preproendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide synthase (ecNOS) expression and NO production in vascular endothelium. J. Clin. Invest. 101, 372-382.
18. Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M. A., Blanco, J., 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. J. Clin. Microbiol. 42, 311-319.
19. Bokete, T. N., Whittam, T. S., Wilson, R. A., Clausen, C. R., O'Callahan, C. M., Moseley, S. L., Fritsche, T. R., Tarr, P. I., 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. J. Infect. Dis. 175, 1382-1389.
20. Brandt, J. R., Fouser, L. S., Watkins, S. L., Zelikovic, I., Tarr, P. I., Nazar-Stewart, V., Avner, E. D., 1994. *Escherichia coli* O 157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. J. Pediatr. 125, 519-526.
21. Brandt, J. R., Joseph, M. W., Fouser, L. S., Tarr, P. I., Zelikovic, I., McDonald, R. A., Avner, E. D., McAfee, N. G., Watkins, S. L., 1998. Cholelithiasis following *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. Pediatr. Nephrol. 12, 222-225.
22. Brunder, W., Khan, A. S., Hacker, J., Karch, H., 2001. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. Infect. Immun. 69, 4447-4457.
23. Bürk, C., Dietrich, R., Acar, G., Moravek, M., Bulte, M., Martlbauer, E., 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. J. Clin. Microbiol. 41, 2106-2112.
24. Caprioli, A., Tozzi, A. E., Rizzoni, G., Karch, H., 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. Emerg. Infect. Dis. 3, 578-579.
25. Cimolai, N., Basalyga, S., Mah, D. G., Morrison, B. J., Carter, J. E., 1994.

A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. Clin. Nephrol. 42, 85-89.

26. Cobbold, R., Desmarchelier, P., 2001. Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. Vet. Microbiol. 79, 323-335.

27. Crump, J. A., Sulka, A. C., Langer, A. J., Schaben, C., Crielly, A. S., Gage, R., Baysinger, M., Moll, M., Withers, G., Toney, D. M., Hunter, S. B., Hoekstra, R. M., Wong, S. K., Griffin, P. M., Van Gi, 2002. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. N. Engl. J. Med. 347, 555-560.

28. Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., Hacker, J., 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. J. Bacteriol. 185, 1831-1840.

29. Dundas, S., Todd, W. T., Stewart, A. I., Murdoch, P. S., Chaudhuri, A. K., Hutchinson, S. J., 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, 923-931.

30. Eklund, M., Scheutz, F., Siitonen, A., 2001. Clinical isolates of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. J. Clin. Microbiol. 39, 2829-2834.

31. Elliott, E. J., Robins-Browne, R. M., O'Loughlin, E. V., Bennett-Wood, V., Bourke, J., Henning, P., Hogg, G. G., Knight, J., Powell, H., Redmond, D., 2001. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. Arch. Dis. Child. 85, 125-131.

32. Ethelberg, S., Olsen, K. E., Scheutz, F., Jensen, C., Schiellerup, P., Enberg, J., Petersen, A. M., Olesen, B., Gerner-Smidt, P., Molbak, K., 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. Emerg. Infect. Dis. 10, 842-847.

33. Feng, P., Lampel, K. A., Karch, H., Whittam, T. S., 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect.

Dis. 177, 1750-1753.

34. Foster, J. W., 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat. Rev. Microbiol. 2, 898-907.

35. Friedrich, A. W., 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, 74-84.

36. Friedrich, A. W., Borell, J., Bielaszewska, M., Fruth, A., Tschape, H., Karch, H., 2003. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. J. Clin. Microbiol. 41, 2448-2453.

37. Friedrich, A. W., Nierhoff, K. V., 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:H- J. Clin. Microbiol. 42, 4697-4701.

38. Friedrich, A., Köck, R., Bielaszewska, M., Zhang, W., Karch, H., Mathys, W., 2005. Distribution of the urease gene cluster and urease activity among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 from humans. J. Clin. Microbiol., in press.

39. Fürst, S., Scheef, J., Bielaszewska, M., Russmann, H., Schmidt, H., Karch, H., 2000. Identification and characterisation of *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shiga toxin genes. J. Med. Microbiol. 49, 383-386.

40. Garg, A. X., Suri, R. S., Barrowman, N., Rehman, F., Matsell, D., Rosas-Arellano, M. P., Salvadori, M., Haynes, R. B., Clark, W. F., 2003. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. JAMA 290, 1360-1370.

41. Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H. M., Zimmerhackl, L. B., 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, 493-500.

42. Geue, L., Segura-Alvarez, M., Conraths, F. J., Kuczius, T., Bockemühl,



- J., Karch, H., Gallien, P., 2002. A long-term study on the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol. Infect.* 129, 173-185.
43. Hancock, D. D., Besser, T. E., Kinsel, M. L., Tarr, P. I., Rice, D. H., Paros, M. G., 1994. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol. Infect.* 113, 199-207.
44. Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hatto, 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8, 11-22.
45. Herold, S., Karch, H., Schmidt, H., 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 115-121.
46. Heuvelink, A. E., Zwartkruis-Nahuis, J. T., van den Biggelaar, F. L., van Leeuwen, W. J., de Boer, E., 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 52, 67-75.
47. Hiruta, N., Murase, T., Okamura, N., 2001. An outbreak of diarrhoea due to multiple antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 in a nursery. *Epidemiol. Infect.* 127, 221-227.
48. Holme, R., 2003. Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water. Sci. Technol.* 47, 1-6.
49. Hoshina, K., Itagaki, A., Seki, R., Yamamoto, K., Masuda, S., Muku, T., Okada, N., 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak caused by contaminated natural water supplied by facility owned by local community. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 247-8.
50. Hurley, B. P., Thorpe, C. M., Acheson, D. W., 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect. Immun.* 69, 6148-6155.
51. 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- Int. J. Med. Microbiol. 292, 207-214.

52. Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M. A., Karch, H., 2003. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. Infect. Immun. 71, 3634-3638.

53. Jelacic, J. K., Damrow, T., Chen, G. S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., Carvalho, H. M., Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. D., Tarr, P. I., 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. J. Infect. Dis. 188, 719-729.

54. Jenkins, C., Pearce, M. C., Smith, A. W., Knight, H. I., Shaw, D. J., Cheasty, T., Foster, G., Gunn, G. J., Dougan, G., Smith, H. R., Frankel, G., 2003. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. Lett. Appl. Microbiol. 37, 207-212.

55. Jordan, D. M., Cornick, N., Torres, A. G., Dean-Nystrom, E. A., Kaper, J. B., Moon, H. W., 2004. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. Infect. Immun. 72, 6168-6171.

56. Karch, H., Wiss, R., Gloning, H., Emmrich, P., Aleksic, S., Bockemühl, J., 1990. Hamolytisch-uramisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*. Dtsch. Med. Wochenschr. 115, 489-495.

57. Karch, H., Bohm, 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- J. Clin. Microbiol. 31, 1200-1205.

58. Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M., Schmidt, H., 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 34, 229-243.

59. Karch, H., 2001. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-associated hemolytic-uremic syndrome. Semin. Thromb. Hemost. 27, 207-213.

60. Karch, H., Bielaszewska, M., 2001. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains: epidemiology, phenotypic and

molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2043-2049.

61. Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M., Lim, C., 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1, 619-620.

62. Keene, W. E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D. H., Hancock, D. D., Balan, V. K., Zhao, T., Doyle, M. P., 1997. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA* 277, 1229-1231.

63. Keskimaki, 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, 3641-3646.

64. Klein, E. J., Stapp, J. R., Clausen, C. R., Boster, D. R., Wells, J. G., Qin, X., Swerdlow, D. L., Tarr, P. I., 2002. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: a prospective point-of-care study. *J. Pediatr.* 141, 172-177.

65. Kuczus, T., Bielaszewska, M., Friedrich, A., W. Zhang, W. A., 2004. A rapid method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*. *Mol. Nutr. Food Res.*, in press.

66. Kudva, I. T., Hatfield, P. G., Hovde, C. J., 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 34, 431-433.

67. Lathem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., Welch, R. A., 2002. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol. Microbiol.* 45, 277-288.

68. Leung, P. H. M., Peiris, J. S. M., Ng, W. W. S., Robins-Browne, R. M., Bettelheim, K. A., Yam, W. C., 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7549-7553.

69. Levine, M. M., Xu, J. G., Kaper, J. B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H., Wachsmuth, K., 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis

and hemolytic uremic syndrome. J. Infect. Dis. 156, 175-182.

70. Liesegang, A., Sachse, U., Prager, R., Claus, H., Steinruck, 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- in Germany - a ten-year study. Int. J. Med. Microbiol. 290, 269-278.

71. Lingwood, C. A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J. L., DeGrandis, S., Karmali, M. A., 1987. Glycolipid binding of natural and cloned *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*. J. Biol. Chem. 262, 8834-8839.

72. Lopez, E. L., Contrini, M. M., Devoto, S., de Rosa, M. F., Grana, M. G., Aversa, L., Gomez, H. F., Genero, M. H., Cleary, T. G., 1995. Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. J. Pediatr. 127, 364-367.

73. Ludwig, K., Sarkim, V., Bitzan, M., Karmali, M. A., Bobrowski, C., Ruder, H., Laufs, R., Sobottka, I., Petric, M., Karch, H., Muller-Wiefel, D. E., 2002. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and antibodies against Stx2 and Stx1 in household contacts of children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 40, 1773-1782.

74. Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milon, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., Loiratm C., Goulet, P., Sansonettim P. J., Elion, J., 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. J. Clin. Microbiol. 31, 296-301.

75. Matussek, A., Lauber, J., Bergau, A., Hansen, W., Rohde, M., Dittmar, K. E., Gunzer, M., Mengel, M., Gatzlaff, P., Hartmann, M., Buer, J., Gunzer, F., 2003. Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cells. Blood 102, 1323-1332.

76. McCarthy, T. A., Barrett, N. L., Hadler, J. L., Salisbury, B., Howard, R. T., Dingman, D. W., Brinkman, C. D., Bibb, W. F., Cartter, M. L., 2001. Hemolytic-uremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. Pediatrics 108, E59.

77. McMaster, C., Roch, E. A., Willshaw, G. A., Doherty, A., Kinnear, W., Cheasty, T., 2001. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11 outbreak in an Irish creche. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20, 430-432.

78. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625.
79. Melton-Celsa, A. R., Darnell, S. C., O'Brien, A. D., 1996. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 64, 1569-1576.
80. Michino, H., Araki, H., Minami, S., Nakayama, T., Ejima, Y., Hiroe, K., Tanaka, H., Fujita, N., Usami, S., Yonekawa, M., Sadamoto, K., Takaya, S., Sakai, N., 1998., Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, DC, pp. 73-81.
81. Misselwitz, J., Karch, H., Bielazewska, M., John, U., Ringelmann, F., Ronnefarth, G., Patzer, L., 2003. Cluster of hemolytic-uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 22, 349-354.
82. Monday, S. R., Minnich, S. A., Feng, P. C. H., 2004. A 12-base-pair deletion in the flagellar master control gene *flhC* causes nonmotility of the pathogenic German sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- strains. *J. Bacteriol.* 186, 2319-2327.
83. Morabito, S., Dell'Omo, G., Agrimi, U., Schmidt, H., Karch, H., Cheasty, T., Caprioli, A., 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet. Microbiol.* 82,275-283.
84. Morabito, S., Tozzoli, R., Caprioli, A., Karch, H., Carattoli, A., 2002. Detection and characterization of class 1 integrons in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 8, 85-91.
85. O'Brien, A. O., Lively, T. A., Chen, M. E., Rothman, S. W., Formal, S. B., 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* 1, 702.
86. O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes,

- S., Sandvig, K., Lindberg, A. A., Keusch, G. T., 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 180, 65-94.
87. Olsen, S. J., Miller, G., Breuer, T., Kennedy, M., Higgins, C., Walford, J., McKee, G., Fox, K., Bibb, W., Mead, P., 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 370-375.
88. Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68, 64-71.
89. Park, C. H., Gates, K. M., Vandell, N. M., Hixon, D. L., 1996. Isolation of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (O157 and non-O157) in a community hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 69-72.
90. Paton, A. W., Ratcliff, R. M., Doyle, R. M., Seymour-Murray, J., Davos, D., Lanser, J. A., Paton, J. C., 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1622-1627.
91. Paton, A. W., Woodrow, M. C., Doyle, R. M., Lanser, J. A., Paton, J. C., 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3357-3361.
92. Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., Paton, J. C., 2004. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.* 200, 35-46.
93. Pennings, C. M., Seitz, R. C., Karch, H., Lenard, H. G., 1994. Haemolytic anaemia in association with *Escherichia coli* O157 infection in two sisters. *Eur. J. Pediatr.* 153, 656-658.
94. Perna, N. T., Plunkett, G. 3., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N.

- W., Lim, A., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529-533.
95. Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S., 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3317-3322.
96. Prager, R., Liesegang, A., Voigt, W., Rabsch, W., Fruth, A., Tschäpe, H., 2002. Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H- in Germany. *Infect. Genet. Evol.* 1, 265-275.
97. Proulx, F., Seidman, E. G., Karpman, D., 2001. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res.* 50, 163-171.
98. Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K., Whittam, T. S., 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406, 64-67.
99. Richardson, S. E., Karmali, M. A., Becker, L. E., Smith, C. R., 1988. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol.* 19, 1102-1108.
100. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681-685.
101. 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, 1055-1061.
102. Schmidt, H., Geitz, C., Tarr, P. I., Frosch, M., Karch, H., 1999b. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* 179, 115-123.
103. Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H., Karch, H., 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1205-1208.
104. Schmitt, C. K., McKee, M. L., O'Brien, A. D., 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains

are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.* 59, 1065-1073.

105. Shaikh, N., Tarr, P. I., 2003. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 185, 3596-3605.

106. Siegler, R. L., 1995. The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Clin. North. Am.* 42, 1505-1529.

107. Sonntag, A., Prager, R., Bielaszewska, M., Zhang, W., Fruth, A., Tschape, H., Karch, H., 2004. Phenotypic and genotypic analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 42, 954-962.

108. Tarr, P. I., Neill, M. A., Clausen, C. R., Watkins, S. L., Christie, D. L., Hickman, R. O., 1990. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J. Infect. Dis.* 162, 553-556.

109. Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C. J., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R., Besser, T. E., 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* 68, 1400-1407.

110. Tarr, P. I., Neill, M. A., 2001. *Escherichia coli* O157:H7. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 30, 735-751.

111. Tazzari, P. L., Ricci, F., Carnicelli, D., Caprioli, A., Tozzi, A. E., Rizzoni, G., Conte, R., Brigotti, M., 2004. Flow cytometry detection of Shiga toxins in the blood from children with hemolytic uremic syndrome. *Cytometry* 61B, 40-44.

112. Te Loo, D. M., Monnens, L. A., van Der Velden, T. J., Vermeer, M. A., Preyers, F., Demacker, P. N., van Den Heuvel, L. P., van Hinsbergh, V. W., 2000. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* 95, 3396-3402.

113. Te Loo, D. M., van Hinsbergh, V. W., van den Heuvel, L. P., Monnens, L. A., 2001. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 800-806.



114. Tilden, J. J., Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S. B., Hollingsworth, J., Morris, J. G. J., 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am. J. Public Health* 86, 1142-1145.
115. Tozzi, A. E., Caprioli, A., Minelli, F., Gianviti, A., De Petris, L., Edefonti, A., Montini, G., Ferretti, A., De Palo, T., Gaido, M., Rizzoni, G., 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 106-108.
116. Varma, J. K., Greene, K. D., Reller, M. E., DeLong, S. M., Trottier, J., Nowicki, S. F., DiOrio, M., Koch, E. M., Bannerman, T. L., York, S. T., Lambert-Fair, M., Wells, J. G., Mead, P. S., 2003. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* 290, 2709-2712.
117. Weinstein, D. L., Jackson, M. P., Samuel, J. E., Holmes, R. K., O'Brien, A. D., 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 170, 4223-4230.
118. Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E. G., Green, J. H., Cameron, D. N., Downes, F. P., Martin, M. L., Griffin, P. M., Ostroff, S. M., 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29, 985-989.
119. Werber, D., Fruth, A., Liesegang, A., Littmann, M., Buchholz, U., Prager, R., Karch, H., Breuer, T., Tschape, H., Ammon, A., 2002. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. *J. Infect. Dis.* 186, 419-422.
120. Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L., Tarr, P. I., 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* 342, 1930-1936.
121. Yu, J., Kaper, J. B., 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 6, 411-417.
122. Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Liesegang, A., Tschape, H., Schmidt, H., Bitzan, M., Karch, H., 2000a. Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. *J. Clin.*

Microbiol. 38, 2134-2140.

123. Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Bockemühl, J., Schmidt, H., Scheutz, F., Karch, H., 2000b. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. J. Clin. Microbiol. 38, 2989-2993.

124. Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T., Karch, H., 2002a. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx<sub>1c</sub>*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 40, 1441-1446.

125. Zhang, W. L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S., Schmidt, H., 2002b. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol. 40, 4486-4492.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. H Karch danke ich für das Überlassen der Arbeit und die stets aufbauende Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ch. von Eiff danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Ich danke ganz besonders meiner Betreuerin Dr. W. Zhang für die viele Unterstützung und die unglaubliche Geduld, mit der sie mich jeden Tag unterstützt hat.

Weiterhin danke ich Frau Martina Bielaszewska, Anne – Katharina Sonntag und dem ganzen Team für die sehr gute Betreuung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann und meinen Eltern für die ausdauernde Ermunterung zur Fertigstellung der Arbeit bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname:	Meng, Natalia
Geburtsdatum:	24.06.1977
Geburtsort:	Perm, RSFSR
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Schulausbildung

09/1983 – 06/1991	Mittelschule in Kohtla-Järve, Estland
09/1991 – 06/1994	Mittelschule in Perm, Russland Abschluss: Abitur

### Berufsausbildung

09/1994 – 07/1996	Studium an der Staatlichen medizinischen Akademie Perm, vier Semester an der pädiatrischen Fakultät; Abbruch wegen Übersiedlung nach Deutschland
-------------------	---

### Übersiedlung

08/1996	Übersiedlung nach Deutschland
---------	-------------------------------

### Weiterbildung

07/1997 – 12/1997	Teilnahme an dem Sprachkurs vom Institut für Bildung und Sprache
04/1998 – 06/2005	Studium an der WWU Münster Fachbereich Humanmedizin
08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2005	Approbation als Ärztin

Münster, den 27.07.2005