

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

**Untersuchungen zur Motilität von
Sorbitol-fermentierenden enterohämorrhagischen
Escherichia coli O157**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Annkatrin Cramer
aus Schleswig
2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: PD Dr. M. Bielaszewska

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene

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

Referent: PD Dr. Martina Bielaszewska

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

Zusammenfassung

**Untersuchungen zur Motilität von
Sorbitol-fermentierenden enterohämorrhagischen
Escherichia coli O157**

Annkatriin Cramer

Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) der Serogruppe O157:H⁻ gelten als unbeweglich und exprimieren kein H-Antigen. In der vorliegenden Arbeit wurde an zehn Stämmen Sorbitol-fermentierender EHEC O157 untersucht, ob sich Motilität durch Passage in semisolidem Agar aufsteigender Konzentration induzieren lässt. Außerdem wurde das für eine Untereinheit des Proteins Flagellin kodierende Gen *fliC* sowie ein Gen des regulatorischen Master-Operons, *flhC*, untersucht und mit Kontrollen verglichen. Hierbei wurde nach vorbeschriebenen Mutationen gesucht, die mit dem Verlust an Motilität in EHEC O157:H⁻ in Verbindung gebracht werden. Stämme, die Motilität zeigten, wurden mittels Latexagglutinationstest auf die Expression von H7-Antigenen sowie elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein von Flagellen untersucht. Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Zugehörigkeit der Stämme zu ihrer Serogruppe durch Bestimmung typischer Virulenzfaktoren und Charakterisierung des Phänotyps verifiziert.

Alle zehn Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ verfügten über eine für ihre Serogruppe typische Kombination bestimmter für Virulenzfaktoren kodierender Gene in Genom und Plasmid. Alle zehn Stämme beherbergten ein intaktes *fliC*. In *flhC* ließ sich in allen Stämmen eine in der Literatur vorbeschriebene 12 bp große Deletion nachweisen. Motilität ließ sich in allen Stämmen beobachten. Drei Stämme zeigten die Expression des H7-Antigens. Flagellentypische Organellen ließen sich elektronenmikroskopisch nicht darstellen, jedoch zeigten sich fimbrienähnliche Organellen, die an unbeweglichen Organismen des gleichen Stammes nicht zur Darstellung kamen.

Diese Arbeit demonstriert, dass Sorbitol-fermentierende EHEC O157 unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, Motilität zu entwickeln und das H7-Antigen zu exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die vorbeschriebene 12 bp-Deletion in *flhC* die Entwicklung von Motilität in EHEC O157:H⁻ nicht verhindert.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	ENTEROHÄMORRHAGISCHE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (EHEC)	1
1.1.1.	Hämorrhagische Colitis und enteropathisches hämolytisch-urämisches Syndrom durch EHEC	1
1.2	PATHOGENITÄTSFAKTOREN	2
1.2.1	Toxine	2
1.2.2	Pathogenitätsinseln und Plasmide	3
1.3	SORBITOL-FERMENTIERENDE EHEC O157:H ⁻	3
1.4	FLAGELLEN UND MOTILITÄT IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	4
1.4.1	Molekularbiologische Grundlagen der Flagellenbildung und Motilität in <i>Escherichia coli</i>	5
1.5	MOTILITÄT SORBITOL-FERMENTIERENDER EHEC O157:H ⁻ : GRUNDLAGEN DIESER ARBEIT	6
1.6	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	6
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	7
2.2	PHÄNOTYPISCHE BESTIMMUNG VON VIRULENZFAKTOREN DER VERWENDETEN SORBITOL-FERMENTIERENDEN EHEC O157:H ⁻ UND DER KONTROLLE EDL 933 (EHEC O157:H7)	10
2.3	UNTERSUCHUNG DER MOTILITÄT	11
2.4	LATEXAGGLUTINATIONSTEST	12
2.5	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	12
2.6	BAKTERIENSTÄMME	12
2.7	NÄHRMEDIEN	13
2.8	LÖSUNGEN UND PUFFER	14
3	ERGEBNISSE	14
3.1	GENOTYPISCHE UND PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN EHEC O157:H ⁻ UND O157:H7 ANHAND VON VIRULENZFAKTOREN	14
3.2	VERGLEICH DER FLAGELLIN-KODIERENDEN GENE VON EHEC O157:H7 UND SORBITOL FERMENTIERENDEN EHEC O157:H ⁻	16
3.2.1	Analyse von <i>fliC</i> mittels RFLP	16
3.2.2	PCR-Analyse von <i>flhC</i> und spezifischer 16s-rDNA	17
3.3	FUNKTIONELLE MOTILITÄTSPRÜFUNG	18
3.4	UNTERSUCHUNG AUF EXPRESSION DES H7-ANTIGENS MITTELS LATEXAGGLUTINATIONSTESTS	20
3.5	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	21
4	DISKUSSION	23
5	LITERATURVERZEICHNIS	27

1 Einleitung

1.1 Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

Als Erreger der hämorrhagischen Colitis traten EHEC erstmals 1982 in den USA in Erscheinung (31). Vor allem in den Industrienationen sind EHEC weltweit als der Hauptauslöser der hämorrhagischen Colitis und des insbesondere bei Kindern unter fünf Jahren auftretenden postinfektiösen enteropathischen hämolytisch-urämischen Syndroms in den Vordergrund getreten. Das enteropathische hämolytisch-urämische Syndrom infolge einer EHEC-Infektion endet für 2-10% der Betroffenen tödlich (11, 16, 17, 19). Galt zunächst *Escherichia coli* O157:H7 als das wichtigste humanpathogene Serovar, so konnten in den Neunziger Jahren zunehmend weitere Serotypen isoliert werden (3). Der bislang größte Ausbruch EHEC-assoziiierter Infektionen ereignete sich 1996 in Sakai City, Osaka, Japan. Hier war eine Gruppe von mehr als 8000 Personen betroffen, v.a. Schulkinder, die sich durch den Verzehr kontaminierter Radieschenkeimlinge im Rahmen der Schulverpflegung infiziert hatten. 106 dieser Kinder erkrankten an einem enteropathischen hämolytisch-urämischen Syndrom, drei von ihnen verstarben (25). Das natürliche Habitat von *Escherichia coli* O157:H7 ist der Darm von Nutztieren, insbesondere von Wiederkäuern, den sie meist vorübergehend kolonisieren. Die Erreger werden dann mit dem Stuhl ausgeschieden. So erfolgt die Übertragung auf den Menschen überwiegend durch kontaminierte Lebensmittel wie unzureichend gegartes Fleisch, Rohwurst, Rohmilchprodukte und kontaminiertes Wasser oder Gemüse (16, 17, 25). Direkte Kontakte zu Wiederkäuern in Landwirtschaft, fleischverarbeitender Industrie, aber beispielsweise auch in Streichelzoos, können ebenfalls zu Infektionen führen (30). Eine Übertragung der pathogenen Keime von Mensch zu Mensch als Schmierinfektion ist wahrscheinlich (29).

1.1.1. Hämorrhagische Colitis und enteropathisches hämolytisch-urämisches Syndrom durch EHEC

Seit 1998 besteht in Deutschland nach §6 IfSG eine Meldepflicht für Verdacht, Erkrankung und Tod an einem enteropathischen hämolytisch-urämischen Syndrom sowie die nachgewiesene symptomatische Infektion durch EHEC (32). Die Infektionsdosis ist aufgrund einer hohen Säuretoleranz des Bakteriums mit weniger als hundert Keimen sehr gering. Die

Inkubationszeit beträgt einen bis maximal acht Tage, bevor ein wässriger Durchfall eintritt, der von Bauchschmerz begleitet ist. Es können sowohl intestinale als auch extraintestinale Komplikationen eintreten. Bei Erwachsenen älter als 65 Jahre ist die häufigste Verlaufsform die hämorrhagische Colitis mit Auftreten blutig-wässriger Stühle. Diese tritt ebenfalls bei 20% der erkrankten Kinder auf. Extraintestinale Komplikationen treten bei 5-10% der erkrankten Kinder unter 6 Jahren auf. Nach erster Besserung der Durchfälle kommt es zu Symptomen eines hämolytisch-urämischen Syndroms, das mit hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen infolge einer toxisch bedingten renalen thrombotischen Mikroangiopathie einhergeht. Dieses endet in ca. 10% der Fälle mit terminalem Nierenversagen und dauerhafter Dialysepflichtigkeit. Es kommen abberante Verlaufsformen vor, bei denen z.B. eine isolierte hämolytische Anämie, eine Pankreatitis sowie Symptome einer zentralnervösen Beteiligung mit Entwicklung eines Hirnödems, Bewusstseinsminderung, ataktischer Bewegungsstörung, epileptischen Anfällen und Paresen auftreten können. Dauerhafte Schädigungen in Form von chronischem Nierenversagen, renaler arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder neurologischen Störungen verbleiben in 50% der Fälle eines hämolytisch-urämischen Syndroms (17).

Die Therapie ist symptomatisch-supportiv. Eine Antibiose verbietet sich in der Akutphase der Erkrankung bei guter Empfindlichkeit der Erreger auf Antibiotika aufgrund der bei Wirkeintritt vermehrten Freisetzung von Shiga Toxin. Auch sind Maßnahmen zur Regulation der Stuhlfrequenz kontraindiziert, da sie das Risiko der Entwicklung des Vollbildes eines hämolytisch-urämischen Syndroms erhöhen. Experimentelle Ansätze in der Therapie, z.B. mit einem oralen Gb3-Rezeptor-Analogen, konnten sich bislang nicht durchsetzen (20, 27).

1.2 Pathogenitätsfaktoren

1.2.1 Toxine

Gemeinsames Merkmal aller EHEC ist die Fähigkeit zur Synthese von Shiga Toxinen (Stx), einer heterogenen Gruppe von Zytotoxinen, die sich in die Hauptgruppen Stx1 und Stx2 gliedert. Hierbei ist es möglich, dass ein EHEC-Stamm die Information für mehrere Toxin-Varianten enthält (33). Bei Shiga Toxinen handelt es sich um rRNA-N-Glykosidasen, die über die Inaktivierung von Ribosomen und damit über die Unterbrechung der Proteinbiosynthese den Zelltod der Zielzelle herbeiführen. Zudem erfolgt die Induktion von Zyto-

kinen und vasokonstriktiven Substanzen. Zielzellen sind kapilläre Endothelzellen, glomeruläre Zellen, renale Tubulus- und Epithelzellen sowie Monozyten. Cytotoxigenes distending toxin (CDT) ist ein in verschiedenen Pathogruppen von *Escherichia coli* vorhandenes Toxin. Bekannt waren hier vier *cdt*-Allele (*cdtI-IV*). Ein Weiteres, *cdt-V*, findet sich bei einem Großteil Sorbitol-fermentierender EHEC O157, die zu 87% CDT exprimieren. Dieses wurde 2003 von Janka et al. beschrieben. In EHEC O157:H7 ist *cdt-V* nur sehr selten zu finden (13, 10).

1.2.2 Pathogenitätsinseln und Plasmide

Für Virulenzfaktoren kodierende Gene finden sich sowohl im bakteriellen Chromosom als auch auf Plasmiden. In EHEC O157:H7 existiert chromosomal u.a. der sog. „Locus of enterocyte effacement“ (LEE). Hierbei handelt es sich um eine 35kb große Pathogenitätsinsel (24). Auf dieser befindet sich unter anderem *eae*, ein Gen, welches für das Oberflächenprotein Intimin kodiert, das im Rahmen der Adhärenz des Bakteriums an die Oberfläche der Darmepithelzelle eine Rolle spielt (34). Für EHEC O157 konnte das Plasmid pO157 identifiziert werden, auf dem die Gene für die Synthese des EHEC-Hämolytins (*EHEC hlyA*), sowie dessen Aktivierung (*hlyC*) und Transport (*hlyB/hlyD*) beherbergt sind. Auf diesem Plasmid sind zudem Gene für eine bifunktionelle Katalase-Peroxidase (*katP*), eine Serin-Protease (*espP*), sowie ein Typ II-Sekretionssystem (*etp*) lokalisiert (35, 36, 37).

1.3 Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H⁻

1988 wurde in Bayern erstmals eine neue Variante von EHEC der Serogruppe O157 als Auslöser des enteropathischen hämolytisch-urämischen Syndroms identifiziert (15). Aufgrund seiner phänotypischen und serologischen Charakteristika wird dieser Erreger unter der Bezeichnung Sorbitol-fermentierender EHEC O157:H⁻ geführt.

Im Unterschied zu den EHEC O157:H7 sind EHEC-Stämme des Serotyps O157:H⁻ in der Lage, Sorbitol aus Nährmedien innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden zu fermentieren. Somit erscheinen sie auf Sorbitol McConkey-Agar (SMAC) als rote Kolonien. Sie exprimieren β -Glucuronidase und zeigen im Gegensatz zu EHEC der Serogruppe O157:H7 keine Telluritresistenz, was auf das Fehlen von *ter*-Genen zurückzuführen ist (2). Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H⁻ gelten als unbeweglich und exprimieren kein H-

Antigen (H⁻). Die ausschließliche Produktion von Stx₂ konnte regelmäßig nachgewiesen werden. Man fand *stx₂* als einziges Shiga Toxin-Gen. Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H⁻ sind im Besitz des für Intimin kodierenden *eae*, sowie eines ca. 90 kb großen Plasmids, das EHEC *hlyA* und die Gen-Cluster *etp* und *sfp*, jedoch im Unterschied zu EHEC O157:H7 nicht *katP* und *espP* enthält (18). Der hämolytische Phänotyp kommt nur selten in Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ vor.

Sfp (Sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid encoded) ist ein Gen-Cluster, das für einen neuartigen Fimbrientyp kodiert und 2001 erstmalig beschrieben wurde (5). Es ist ein 32 kb großes Fragment, das mit einem Cluster aus sechs Genen (*sfpA*, *sfpH*, *sfpC*, *sfpD*, *sfpJ*, *sfpG*), die eine Hämagglutination und die Expression von Sfp-Fimbrien vermitteln, ausgestattet ist. *Sfp* wurde bislang weder in anderen EHEC-Stämmen, noch in anderen Mitgliedern der Familie der *Enterobacteriaceae* wieder gefunden und ist damit ein einzigartiges Charakteristikum der Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ (8).

1.4 Flagellen und Motilität in *Escherichia coli*

Die meisten Wildtyp-Stämme von *Escherichia coli* sind beweglich. Diese Beweglichkeit wird durch Flagellen erreicht. Sie sind in der Lage, sich in flüssigem Medium schnell und mit häufigen Richtungswechseln zu bewegen (23). Dies wird mittels Rotation der flagellaren Filamente bewerkstelligt, die von einer Motoreinheit an ihrer Basis passiv bewegt werden. Eine Rotation der Filamente gegen den Uhrzeigersinn erzeugt eine Vorwärtsbewegung der Zelle. In einem flüssigen Medium bei Raumtemperatur erreicht die Drehgeschwindigkeit der flagellaren Filamente etwa 100 Hz und treibt die einzelne Zelle mit einer Geschwindigkeit von bis zu 50 µm/s an. Dieser Modus wird als „Schwimmen“ bezeichnet. Dieses dauert einige Sekunden und steht im stetigen Wechsel mit dem so genannten „Taumeln“ („tumble“) der Zelle, welches durch den abrupten Wechsel der flagellaren Rotationsrichtung hin zu einer Bewegung im Uhrzeigersinn zustande kommt. Diese Bewegungsphase ist kürzer als die des Schwimmens. Hinzu kommen Phasen, in denen die Drehgeschwindigkeit der flagellaren Filamente gegen Null geht. Diese „Pausen“ kommen nicht regelhaft vor. Auch in halbfestem Medium sind Zellen von *Escherichia coli* in der Lage zu schwimmen. Hier bewegen sie sich durch wässrige Kanäle zwischen den Gelbestandteilen hindurch (23).

Escherichia coli sind peritrich begeißelt. Die einzelnen flagellaren Filamente haben eine durchschnittliche Länge von 5-10 µm und einen Durchmesser von etwa 20 nm. Ein flagel-

lares Filament besteht aus einer Zusammensetzung von ca. 20.000 Untereinheiten des Proteins Flagellin, angeordnet in einer linksläufigen helikalen Struktur (23). Das Flagellin fungiert als H-Antigen des Bakteriums und wird damit seit 1930 als eines der Hauptantigene zur serologischen Einteilung gramnegativer Bakterien in Serovare herangezogen (41). Neben der Expression intakter Bestandteile von Flagellen spielen eine Vielzahl weiterer Faktoren, wie z.B. der korrekte Zusammenbau dieser Elemente und das Vorhandensein von Chemorezeptoren eine Rolle bei der Entstehung einer zielgerichteten Beweglichkeit von *Escherichia coli*.

Insbesondere für gramnegative Organismen sind auch Formen flagellen-unabhängiger Beweglichkeit bekannt. 1961 wurde eine als „twitching motility“ bezeichnete Beweglichkeit auf soliden Oberflächen für *Acinetobacter calcoaceticus* beschrieben (21). Diese Form der Beweglichkeit ist über Typ IV-Fimbrien vermittelt und ist heute auch für *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseriaceae* und *Moraxella* ssp. untersucht (38). Eine weitere Form von Motilität ist die „gliding motility“, die an *Myxococcus xanthus* beobachtet wurde und die auf der Ausscheidung schleimiger Polysaccharide beruht, die ein Gleiten auf Oberflächen ermöglichen (21, 42).

1.4.1 Molekularbiologische Grundlagen der Flagellenbildung und Motilität in *Escherichia coli*

Ein System aus mehr als 40 Genen bedingt die Struktur, den Zusammenbau und die Funktion der Flagellen von *Escherichia coli*. Diese sind in 15 Operons organisiert. Diese Operons stehen in hierarchischer Folge als Regulon zusammen, dem das Master-Operon *flhDC* (Klasse1) übergeordnet ist. Seine beiden Genprodukte sind für die Expression aller weiteren Gene in diesem Regulon essentiell. Was als Transkriptionsfaktor für das Master-Operon selbst dient, wird diskutiert. Die untergeordneten Klasse-2-Operons sind *flhDC*-abhängig. Unter ihnen befinden sich strukturelle Gene, die für Basalkörper und Haken der Flagellen kodieren sowie ein für den σ -Faktor FliA codierendes Gen. Der σ -Faktor FliA setzt insbesondere auf Ebene der Klasse-3-Operons regulativ an (23). Zu den Klasse-3-Genen zählt unter anderem *fliC*, das für die Hauptuntereinheit des flagellaren Filament-Proteins Flagellin kodiert.

1.5 Motilität Sorbitol-fermentierender EHEC O157:H⁻: Grundlagen dieser Arbeit

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ das komplette, für die Hauptuntereinheit des flagellaren Filament-Proteins Flagellin kodierende *fliC*-Gen besitzen. Dieses zeigt ein RFLP-Profil, welches dem der H7-Gruppe gleicht (1, 7, 28). Reid et al. untersuchten 1999 die Diversität der *fliC*-Allele in pathogenen *Escherichia coli*. Sie konnten in den von ihnen untersuchten EHEC O157:H⁻ Insertionen in *fliC* darstellen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zur Entstehung eines verfrühten Stop-Codons führen (28). Dies brachten sie mit der Unfähigkeit zur Produktion funktioneller Flagellen in Verbindung.

2004 fanden Monday et al. in Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ eine 12 bp umfassende Deletion in *flhC*, einem Bestandteil des Master-Operons *flhDC*, die sie für den Verlust der Motilität in diesen Stämmen verantwortlich machten (26). Die durch Reid et al (28) vorgeschriebenen Insertionen in *fliC* konnten für die Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ Stämme in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. 1996 hatten Feng et al. festgestellt, dass sich Motilität in den von ihnen untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ durch das übliche Verfahren mittels Passage durch semisoliden Agar nicht herstellen ließ (6).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob Motilität und die Expression von H-Antigen in Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ mittels Passage durch semisoliden Agar induzierbar ist. Bei Nachweis einer Expression von H7-Antigen sollte elektronenmikroskopisch untersucht werden, ob sich Flagellen morphologisch darstellen. Im Zusammenhang damit sollten das für die Hauptuntereinheit des Proteins Flagellin kodierende Gen *fliC* und ein Gen des regulatorischen Master-Operons, *flhC*, in den verwendeten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻-Stämmen und Kontrollen untersucht und verglichen werden. Die untersuchten Stämme wurden zuvor anhand von typischen Pathogenitätsfaktoren molekularbiologisch und phänotypisch charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Untersuchungen

2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ansatz für 25 µl je Probe:

Aqua dest.	12,35	µl
Puffer Y, 10-fold concentrated	2,5	µl
Enhancer	5,0	µl
MgCl ₂	0,75	µl
dNTP	0,5	µl
Primer 1	0,5 µl (30 pmol)	
Primer 2	0,5 µl (30 pmol)	
Taq-Polymerase	0,4	µl
Bakteriensuspension	2,5	µl

Die zur PCR-Analyse ausgewählter spezifischer Genabschnitte verwendeten Primer, deren Oligonukleotidsequenzen sowie die jeweiligen Bedingungen der durchgeführten PCRs sind aus Tabelle 1 und 2 ersichtlich. Alle Oligonukleotide wurden bezogen von Sigma-ARK GmbH, Steinheim, die PCR-Reagenzien von PEQLAB Biotechnologie, Erlangen.

Die kombinierte Analyse von *flhC* und spezifischer 16s-rDNA im Rahmen einer Multiplex-PCR erfolgte in Anlehnung an das von Monday et al (26) beschriebene Verfahren. Es kamen die Thermocycler T Personal und T Gradient der Firma Biometra, Göttingen, zum Einsatz.

Für die Bakteriensuspension wurden einige Kolonien des zu untersuchenden Stammes dem jeweiligen Nährmedium entnommen, in 50 µl NaCl 0,9% suspendiert und 5 min bei 99°C inaktiviert.

Tabelle 1: PCR-Primer und Bedingungen für die Untersuchung von Virulenzgenen Sorbitol-fermentierender EHEC O157:H⁷

Primer	Oligonukleotidsequenz (5' - 3')	Gen	PCR-Bedingungen ^a			Produkt (bp)	Positiv-Kontrolle ^b	Referenz
			2)	3)	4)			
SK1 SK2	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	<i>eae</i>	94°C, 30 s	52°C, 60 s	72°C, 60 s	863	EDL933	Zhang et al, 2000
Iha-I Iha-II	CAG TTC AGT TTC GCA TTC ACC GTA TGG CTC TGA TGC GAT G	<i>iha</i>	94°C, 30 s	56°C, 60 s	72°C, 90 s	1305	4797/97	Schmidt et al, 2001
E643f E1598r	TAT CAG GCC AAT CAA AAC AG AGA CAC TGG TAA ATT TCG C	<i>efa1-1^c</i>	94°C, 30s	50°C, 60s	72°C, 60s	974	493/89	Janka et al, 2002
E5242f E5854r	TAA GCG AGC CCT GAT AAG CA CGT GTT GCT TGC CTT TGC	<i>efa1-2^c</i>	94°C, 30s	55°C, 60s	72°C, 60s	630	493/89	Janka et al 2002
E7044f E7710r	TGT CTA ACT GGA TTG TAT GGC ATG TTG TTC CCG GCC CAG T	<i>efa1-3^c</i>	94°C, 30s	56°C, 60s	72°C, 60s	685	493/89	Janka et al, 2002
IpfO141-F IpfO141-R	CTGCGCATTGCCGTAAC ATTACAGGGCAGATCGTG	<i>IpfA_{O157/}</i> <i>O1-141</i>	94°C, 60s	55°C, 60s	72°C, 60s	412	EDL933	Toma et al, 2004
O154-FCT O154-RCT	GCAGGTCACCTACAGGGCGGC CTGCGAGTCGGCGTTAGCTG	<i>IpfA_{O157/}</i> <i>O1-154</i>	94°C, 60s	55°C, 60s	72°C, 60s	525	EDL933	Toma et al, 2004
HlyA1 HlyA4	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G TCTCGCCTG ATA GTG TTT GGT A	<i>EHEC- hlyA</i>	94°C, 30 s	57°C, 60 s	72°C, 90s	1550	EDL933	Schmidt et al, 1995
katP-1 katP-2	GGC GGA AGA GAA GAT GAC TG GCC ACA GTC TCC TCA TCA TC	<i>katP</i>	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 60s	236	EDL933	Zhang, unveröffentlicht
esp-A esp-B	AAA CAG CAG GCA CTT GAA CG GGA GTC GTC AGT CAG TAG AT	<i>espP</i>	94°C, 30 s	56°C, 60 s	72°C, 180s	1830	EDL933	Brunder et al, 1997
D1 D13R	CGTCAGGAGGATGTTTCAG CGACTGCACCTG TTC CTG ATT A	<i>etpD</i>	94°C, 30 s	56°C, 60 s	72°C, 90 s	1062	EDL933	Zhang et al, 2000
sfpA-U sfpA-L	AGCCAAGGCCAAGGGATTATTA TTAGCAACAGCAGTGAAG TCTC	<i>sfpA</i>	94°C, 30 s	59°C, 60 s	72°C, 60 s	440	493/89	Friedrich et al, 2004
c338f c2135r	AGC ATT AAA TAA AAG CAC GA TAC TTG CTG TGG TCT GCT AT	<i>cdt-VA^d</i>	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 90s	1329	493/89	Janka et al, 2003
c1309f c2166r	AGC ACC CGC AGT ATC TTT GA AGC CTC TTT TAT CGT CTG GA	<i>cdt-VB^d</i>	94°C, 30s	52°C, 60s	72°C, 90s	1363	493/89	Janka et al, 2003
P105 c2767r	GTC AAC GAA CAT TAG ATT AT ATG GTC ATG CTT TGT TAT AT	<i>cdt-VC^d</i>	94°C, 30s	49°C, 60s	72°C, 60s	748	493/89	Janka et al, 2003
TerE1 TerE2	TAAAAGGCGCAACGTATCTC TGA CCGTCCCCTTGTCTGTTGTAA	<i>terE</i>	94°C, 30 s	55°C, 60 s	72°C, 60 s	353	EDL933	Taylor et al, 2002
UreD-f UreD-r	CGTCATCATGTCCGGTCTGCTCA GCGTGGCTCCGGCGTAGTTTT	<i>ureD</i>	94°C, 60 s	63°C, 60 s	72°C, 40 s	569	EDL933	Friedrich et al, 2005

^aAlle PCRs: Schritt1: Denaturierung (94°C, 5min), Schritte 2, 3, 4 wie in der Tabelle beschrieben, Schritt 5: Abschließende Kettenverlängerung (72°C, 5min)

^bDie Kontrollstämme stammen aus der Sammlung des Instituts für Hygiene der Universität Münster

^cMit den PCRs *efa-1*, *efa-2* und *efa-3* wurden drei verschiedene Regionen des *efa1*-Gens (5', Mitte, und 3') amplifiziert (12)

^dDrei Gene des *cdt-V* clusters (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) wurden untersucht (13)

Tabelle 2: PCR-Primer und Bedingungen für die Amplifikation von *fliC*, *flhC* und 16s-rDNA

Gen	Primer	Oligonukleotidsequenz (5' - 3')	PCR-Bedingungen			Produkt (bp)
			1)	2)	3)	
<i>fliC</i>	FSa1	CAA GTC ATT AAT AC(A/C) AAC AGC C	94°C, 30s	50°C, 60s	72°C, 120s	1500
	rFSA1	GAC AT(A/G) TT(A/G) GA(G/A/C) ACT TC(G/C) GT				
<i>flhC</i>	SRM 11A	ACT GTA CCG AGA ACA ACC AGG	95°C, 60s	56°C, 45s	72°C, 60s	379
	SRM 19	TGG TGC GGT TTG AAA G				
16s-rDNA	SRM 86	GCT AGT TGG TAA GGT AAC GGC T	95°C, 60s	56°C, 45s	72°C, 60s	562
	SRM 87	GTG GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC				

1) Denaturierung 2) Primerbindung 3) Kettenverlängerung

2.1.2 Restriktionsfragmentlängenanalyse

Der Restriktionsverdau wurde in Anlehnung an die von Fields et al (7) beschriebene Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(RFLP)-Analyse von *fliC* durchgeführt.

Die 1500bp umfassenden Produkte der PCR-Amplifikation von *fliC* wurden mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* verdaut und die Restriktionsfragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Dazu wurden 17 µl PCR-Produkt mit *RsaI* (New England Biolabs, Frankfurt) und dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer versetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in 2% igen Agarosegelen bei 80 Volt über sechs Stunden.

2.1.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten kamen etwa 5 mm dicke horizontale Flachgele zum Einsatz. Agarose für analytische Zwecke wurde in für die gewünschte Konzentration notwendiger Menge in 0,5 x TBE-Puffer eingewogen und aufgekocht. Nach Abkühlung

auf ca. 55°C konnte diese in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen werden. Das abgekühlte Gel wurde in die jeweiligen Elektrophoresekammern (ComPhor Mini, ComPhor Midi, Biozym GmbH, Oldendorf) eingesetzt und mit 0,5 x TBE-Puffer überschichtet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Stopmix versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandart diente der 1 kb-DNA-Leiter von Invitrogen. Die Elektrophorese erfolgte regulär bei einer Feldstärke von 5 V/cm Elektrodenabstand. Davon abweichende Bedingungen sind jeweils bei den betreffenden Methoden dokumentiert. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 20-30 Min in ein Ethidiumbromidbad gegeben. Die angefärbten DNA-Anteile waren nun unter UV-Licht als unterschiedlich breite Banden sichtbar. Die Dokumentation erfolgte fotografisch.

2.2 Phänotypische Bestimmung von Virulenzfaktoren der verwendeten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ und der Kontrolle EDL 933 (EHEC O157:H7)

Die Fähigkeit zur Fermentation von Sorbitol wurde durch Bebrütung auf SMAC-Agar über 24 Stunden überprüft.

Die Produktion von β -D-Glucuronidase wurde auf MUG-(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronidase)-haltigem Agar der Firma DIFCO (Kat. Nr. 223100) getestet.

Zur Feststellung des enterohämolytischen Phänotyps wurden die Stämme auf Blutagar mit 5% gewaschenen Schaferythrozyten und 10 mM CaCl₂ (Enterohämolysin-Agar) der Firma Sifin, Berlin, über Nacht inkubiert. Bei positivem Befund zeigte sich eine schmale, trübe Hämolysezone.

Die Produktion von Shiga Toxin wurde mit Hilfe des Vero cell cytotoxicity assays (19) ermittelt.

Auf Cefixim-Tellurit-SMAC-Agar wurden die Stämme auf Telluritresistenz untersucht. Diese ist vorhanden, wenn sich auf o.g. Nährboden Wachstum zeigt.

Die Expression von CDT wurde mittels Chinese Hamster Ovary Cell (CHO) assay untersucht (13).

2.3 Untersuchung der Motilität

Um die Motilität der ausgewählten Sorbitol-fermentierenden EHEC Stämme zu prüfen, wurde deren Bewegungsfähigkeit in Luria-Bertani (LB)-Agar in aufsteigender Konzentration von 0,2-0,8% durch U-förmige Glasröhrchen getestet.

Hierzu wurden jeweils etwa 3,5 ml des entsprechend konzentrierten LB-Agars mit einer Pipette in die sterilen Glasröhrchen gegeben. Nach Verfestigen des Agars wurde wenig Bakterienmaterial mit einer Impföse von einer LB-Platte entnommen und im Stich etwa 0,8 mm tief an einer der beiden Öffnungen der U-Röhrchen eingeimpft. Hierbei war besonders darauf zu achten, den Impfstich mittig in den Agar zu platzieren, um den Kontakt zur Glaswand zu vermeiden. Die Röhrchen wurden steril verschlossen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Nach 24 Stunden ließ sich das vertikale Bakterienwachstum anhand eines Scores beurteilen und dokumentieren. Motilität zeigte sich als wolkiges, von der Impfstelle aus fortschreitendes Wachstum. War das Röhrchen komplett durchwandert und Wachstum auf der Oberfläche des Agars an der der Impfstelle gegenüberliegenden Öffnung sichtbar, so konnte mit einer Impföse Material von dieser Oberfläche entnommen und in ein frisch vorbereitetes Röhrchen eingebracht werden. Dieses wurde ebenfalls bei 37°C bebrütet. War kein bakterielles Wachstum an der Oberfläche sichtbar, wurde das Röhrchen im Brutschrank belassen und nach weiteren 24 Stunden das Fortschreiten des Wachstums beurteilt. Die maximale Beobachtungszeit betrug 10 x 24 Stunden. Hatte sich nach dieser Zeit nicht das typische Wachstum gezeigt, schien die Entwicklung von Motilität in dieser Probe unwahrscheinlich. Die Probe wurde verworfen und für diesen Stamm ein erneuter Versuch nach gleichem Schema begonnen.

Das Experiment wurde in einer Agarkonzentration von 0,2% begonnen.

Stämme, die in 0,2%igem LB-Agar regelmäßig Passagezeiten von 2 x 24 Stunden und weniger zeigten, wurden in Agar mit einer Konzentration von 0,4% überführt.

Stämme, die hier in 0,4%igem Agar Passagezeiten von weniger als 10 x 24 Stunden aufwiesen, wurden in Agar mit einer Konzentration von 0,6% eingebracht.

Zeigten sie auch hier Motilität nach den oben genannten Kriterien, wurde diese schließlich auch in Agar mit einer Konzentration von 0,8% überprüft.

Die Kriterien zur Beurteilung der Motilität blieben stets unverändert.

Referenzen zur Methodik zur Prüfung von Motilität in *Escherichia coli* siehe Anhang.

2.4 Latexagglutinationstest

Die erfolgreich durch 0,4%igen Agar gewanderten Stämme 2492/00 (Passagezeit 48h), E03/053 (Passagezeit 96h), 340/97 (Passagezeit 48h) sowie der in einer Passagezeit von 96h durch 0,8%igen Agar gewanderte Stamm 3072/96 wurden Latexagglutinationstests mit Anti-H7 sowie Anti-O157 unterzogen (Coloured latex agglutination kit for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, Wellcolex *Escherichia coli* O157:H7, bezogen von REMEL, cat. No. 30959601, ZC61). Hierzu wurde das jeweilige Antiserum, welches mit Antikörper beschichtete Latexpartikel enthält, mit dem in einem Tropfen NaCl 0,9% suspendierten Bakterienmaterial zusammengebracht und geschwenkt. War der Test positiv, so zeigten sich Agglutinate auf der Testkarte.

2.5 Elektronenmikroskopie

Es erfolgte die Untersuchung zweier Sorbitol-fermentierender EHEC O157:H⁻ Stämme (3072/96, 2841/01) mit dem Elektronenmikroskop TEM:EM 410 der Firma Philips Medizin Systeme Hamburg. Die Proben wurden in der Kontrastierungstechnik Negative Stain dargestellt. Die verwendeten Materialien (für Negative Stain: Kupfergrids als Träger, Phosphorwolframsäure, Uranylacetat, Formvar) wurden bezogen über Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg und Plano GmbH, Wetzlar.

Von beiden Stämmen wurden möglichst agarfreie Kolonien zum einen von einer LB-Platte, zum anderen nach Passage durch 0,8%igen Agar entnommen, und jeweils zwei Suspensionen hergestellt. Als dritter Stamm wurde der EHEC O157:H7 03/250 untersucht. Dieser Stamm wurde einem U-Röhrchen entnommen, nachdem er 0,8%igen Agar durchwandert hatte. Der Vergleich erfolgte unter 21.000-facher Vergrößerung.

2.6 Bakterienstämme

Die untersuchten EHEC-Isolate stammen aus dem Bestand des Instituts für Hygiene der Universität Münster. Es handelt sich dabei größtenteils um aus Stuhlproben isolierte Keime, die über mehrere Jahre hinweg von Patienten gewonnen werden konnten. Zehn Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H⁻ Stämme wurden auf die Fähigkeit zur Entwicklung von Motilität untersucht (Stammnummern: 3072/96, 340/97, 3573/98, 2584/99, 2492/00, 2841/01, 129/02, 813/02, E 03/049, E 03/053). Der Stamm 493/89 diente als Referenzstamm der Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻. Als positive Kontrolle für

Motilität wurde ein Nicht-Sorbitol-fermentierender EHEC der Serogruppe O157:H7 mit der Stammnummer 03/250 untersucht.

Zur Untersuchung von *fliC* sowie des Regulatorgens *flhC* wurden zusätzlich neun weitere Nicht-Sorbitol-fermentierende Stämme der Serogruppe O157:H7 herangezogen (Stammnummern: 3232/96, 2857/98, 2085/98, 865/99, 2483/00, DN 771/01, 02/476, 02/846, 03/187). Als weiterer Referenzstamm diente hier der EHEC O157:H7-Stamm EDL 933. Ein Stamm der Serogruppe O157:H43 (Stammnummer: 241-36/88) wurde im Rahmen der RFLP-Analyse von *fliC* benötigt (Tab.3).

Tabelle 3: Bakterienstämme für RFLP-Analyse von *fliC*

SF O157:H7	Kontrollen	
	O157:H7	O157:H43
3072/96	EDL 933	241-36/88
340/97		
3573/98		
2584/99		
2492/00		
2841/01		
129/02		
813/02		
E03/049		
E03/053		
493/89		

2.7 Nährmedien

LB-Medium:

Ansatz für 500 ml

NaCl	5,0 g
Pepton aus Soja	5,0 g
Hefeextrakt	2,5 g
Wasser(deionisiert)	500 ml

Der Ansatz wurde autoklaviert.

LB-Agar:

Zur Herstellung des LB-Agars zu Zwecken der Motilitätsprüfung wurden jeweils 100 ml LB-Medium mit der der gewünschten Konzentration entsprechenden Menge Bacto-Agar (DIFCO Laboratories, Detroit, USA) versetzt, autoklaviert und bis zur Verwendung bei 55 C° gelagert. LB-Agarplatten zur Anzucht der Stämme auf Vollmedium wurden mit LB-Agar (Lennox) der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe hergestellt. Die verwendeten SMAC- und Cefixim-Tellurit-SMAC-Agarplatten stammten aus der Nährbodenküche des Instituts für medizinische Mikrobiologie des UKM.

2.8 Lösungen und Puffer

TBE-Puffer (5-fach):

Tris-Base	54	g
Borsäure	27,5	g
0,5 M EDTA pH8	20	ml
Wasser (deionisiert)	1000	ml

Probenpuffer („Stopmix“) für DNA:

0,1% Bromphenolblau	2,5	ml
0,1% Xylencyanol	1,0	ml
0,01% SDS	10	µl
0,025 M EDTA pH 8,0	0,5	ml
50% Glycerin	6,0	ml

Alle Reagenzien wurden bezogen von Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypische und phänotypische Charakterisierung der verwendeten EHEC O157:H⁻ und O157:H7 anhand von Virulenzfaktoren

Alle zehn Sorbitol-fermentierenden EHEC O157 verfügten über eine für ihre Serogruppe typische Kombination bestimmter für Virulenzfaktoren kodierender Gene. So konnten *stx*₂ als einziges Shiga Toxin-Gen, *eae*, das komplette *efa1*-Gen und *lpfA*_{O157} nachgewiesen werden. Acht der zehn untersuchten Stämme beherbergten das *cdt*-V-Operon (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). Die Plasmid-Gene EHEC-*hlyA*, *etpD* und *sfpA* waren in allen 10 Stämmen

vorhanden, *katP* und *espP* jedoch nicht. Zur Identifikation der für Telluritresistenz und Urease kodierenden Gen-Cluster wurden *terE* und *ureD* untersucht, die ebenfalls negativ waren. Diese Ergebnisse stimmen mit denen des mituntersuchten Kontrollstamms 493/89 überein. Als Repräsentant der Serogruppe O157:H7 fungierte der Stamm EDL 933, der ebenfalls eine für seine Serogruppe typische Befundkonstellation zeigte.

Tabelle 5: Resultate der Untersuchung der verwendeten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ und der Kontrollen EDL 933 und 493/89 auf das Vorhandensein ausgewählter Virulenzgene

Stamm Nr.	Toxine		Adhäsine							Plasmid-Gene					Andere	
	stx	cdt- V ^a	eae	<i>iha</i> ^b	<i>efa1</i> -1 ^c	<i>efa1</i> -2 ^c	<i>efa1</i> -3 ^c	<i>lpfA</i> _{O157- O141} ^d	<i>lpfA</i> _{O157- O154} ^d	EHEC- <i>hlyA</i>	<i>katP</i>	<i>espP</i>	<i>etpD</i>	<i>sfpA</i>	<i>terE</i> ^e	<i>ureD</i> ^f
93/89	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
3072/96	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
340/97	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
3573/98	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
2584/99	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
2492/00	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
2841/01	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
129/02	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
813/02	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
E03/049	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
E03/053	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
EDL933	1+2	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

^aIn allen *cdt*-positiven Stämmen waren alle drei Komponenten des *cdt*-V-Clusters (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) vorhanden. *cdtV* ist in der Mehrzahl der Sorbitol-fermentierenden EHEC O157, jedoch nur sehr selten in O157:H7 nachweisbar (13).

^b*iha*, *ter* und *ure* sind in O157:H7 stets vorhanden und finden sich dort auf den sog. O islands (OI) OI-43 und/oder OI-48. Sorbitol-fermentierende EHEC O157 besitzen diese nicht (2, 14).

^cMit den PCRs *efa*-1, *efa*-2 und *efa*-3 wurden drei verschiedene Regionen des *efa1*-Gens (5', Mitte, und 3') amplifiziert. Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H⁻ besitzen das komplette *efa1*-Gen (9.672bp), wohingegen in EHEC O157:H7 nur die 5'-Region dieses Gens zu finden ist (12).

^d*lpfA*_{O157} kodiert für eine Hauptuntereinheit der sog. „long polar fimbriae“. Diese finden sich auf O157:H7 EDL 933 auf den „O-Inseln“ OI141 und OI154. Diese sind ebenfalls in Sorbitol-fermentierenden EHEC O157 enthalten, kommen jedoch nicht in anderen Serotypen vor (Ausnahme: EHEC O145:H28/NM enthält *lpfA*_{O157-OI141}).

^e*terE* wurde als Marker für das *ter* Gen-Cluster genutzt, welches für Telluritresistenz kodiert.

^f*ureD* wurde als Marker für das Urease Gen-Cluster genutzt, welches für Urease kodiert.

Im Phänotyp unterschieden sich die zehn untersuchten Sorbitol-fermentierenden Stämme ebenso wie die Kontrolle 493/89 in charakteristischer Weise von EDL 933. Diejenigen Stämme, die nicht das *cdtV*-Gen trugen (Tab. 5), zeigten entsprechend keine nachweisbare CDT-Produktion (Tab. 6).

Tabelle 6: Resultate der phänotypischen Bestimmung ausgewählter Virulenzfaktoren der verwendeten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ und der Kontrollen 493/89 und EDL 933

Stamm Nr.	Sorbitol-Fermentation	β -D-Glucuronidase	EHEC-Hämolyisin	Telluritresistenz	Stx-Titer	CDT-Titer
493/89	+	+	-	-	1:512	1:4
3072/96	+	+	-	-	1:1024	1:8
340/97	+	+	-	-	1:512	1:8
3573/98	+	+	-	-	1:2048	1:4
2584/99	+	+	-	-	1:1024	1:4
2492/00	+	+	-	-	1:512	1:4
2841/01	+	+	-	-	1:2048	n.d. ^a
129/02	+	+	-	-	1:512	1:8
813/02	+	+	-	-	1:512	n.d. ^a
E03/049	+	+	-	-	1:1024	1:4
E03/053	+	+	-	-	1:512	1:8
EDL 933	-	-	+	+	1:4096	n.d. ^a

^an.d.: nicht durchführbar, da diese Stämme kein *cdt*-Gen enthalten

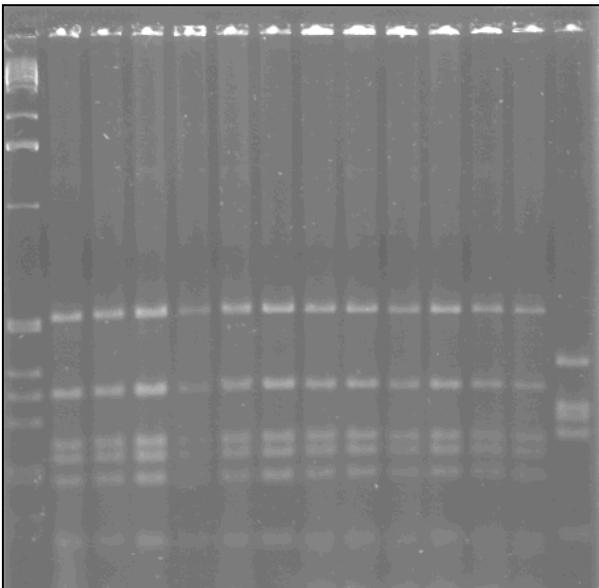
3.2 Vergleich der Flagellin-kodierenden Gene von EHEC O157:H7 und Sorbitol fermentierenden EHEC O157:H⁻

3.2.1 Analyse von *fliC* mittels RFLP

Für die unter 2.6 beschriebenen EHEC-Isolate erfolgte die PCR-Amplifikation des Genabschnitts, auf dem das für die Hauptuntereinheit des Proteins Flagellin kodierende Gen *fliC* lokalisiert ist. Mit dem entstandenen 1500 bp umfassenden PCR-Produkt wurde anschließend ein Restriktionsendonukleasen-Verdau durchgeführt. Die zehn Isolate der Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ sowie der Referenzstamm 493/89 zeigten ein zu EDL 933 identisches Bandenmuster in der Gelelektrophorese. Das Muster des verwendeten Stammes des Serotyps O157:H43 wich von diesem deutlich ab (Abb. 1).

Abbildung 1: Gelelektrophorese der RFLP-Analyse von *fliC*

kb 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H7: 2: 3072/96; 3: 340/97; 4: 3573/98; 5: 2584/99; 6: 2492/00; 7: 2841/01; 8: 129/02; 9: 813/02; 10: E03/049; 11: E03/053

Kontrollen: 1: EDL 933 (EHEC O157:H7); 12: 493/89 (EHEC O157:H7); 13: 241-36/88 (*E. coli* O157:H43)

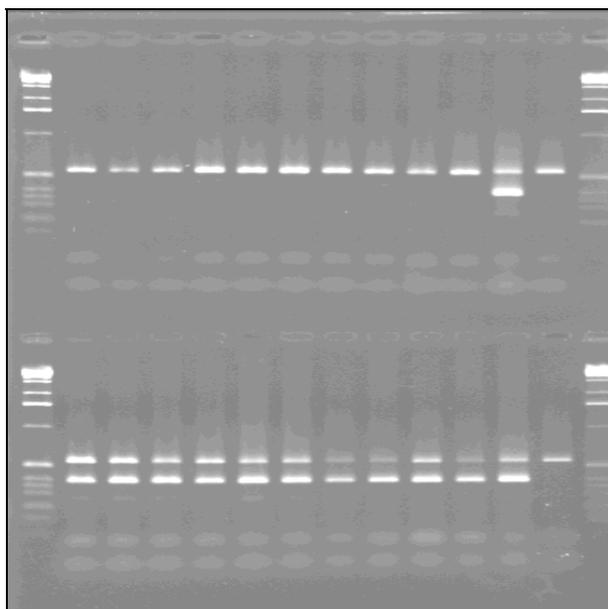
3.2.2 PCR-Analyse von *fliC* und spezifischer 16s-rDNA

Die in 2.6. beschriebenen Stämme wurden einer PCR-Analyse hinsichtlich des Vorhandenseins des intakten *fliC*-Gens, bzw. im Umkehrschluss auf das Vorhandensein der von Monday et al (26) beschriebenen 12 bp-Deletion in *fliC* unterzogen. Mittels Multiplex-PCR konnte im gleichen Schritt der Nachweis der für speziesspezifische ribosomale RNA kodierenden DNA-Abschnitte erbracht werden. 16s-rDNA hat eine Größe von 562 bp. Eine entsprechende Bande in der Gelelektrophorese ließ sich in allen Proben nachweisen.

Das intakte *fliC*-Gen ist 379 bp lang. Hier zeigten sich nach der Auftrennung entsprechende Muster bei allen EHEC O157:H7-Isolaten (Abb.2, untere Reihe, 1-10) nicht jedoch bei den untersuchten Proben der Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H7 (Abb. 2, obere Reihe, 1-10). Damit ist aufgezeigt, dass die von Monday et al (26) beschriebene Deletion im Regulatorgen *fliC* in allen hier untersuchten SF O157:H7 vorhanden ist.

Abbildung 2: Gelelektrophorese der PCR-Analyse von *flhC* und 16s-rDNA

kb 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 kb



Obere Reihe: 1: 3072/96; 2: 340/97; 3: 3573/98; 4: 2584/99; 5: 2492/00; 6: 2841/01; 7: 129/02; 8: 813/02; 9: E03/049; 10: E03/053; 11: EDL 933; 12: 493/89

Untere Reihe: 1: 3232/96; 2: 2857/98; 3: 2085/98; 4: 865/99; 5: 2483/00; 6: DN-771/01; 7: 02/476; 8: 02/846; 9: 03/187; 10: 03/250; 11: EDL 933; 12: 493/89

3.3 Funktionelle Motilitätsprüfung

Um die Fähigkeit zur Entwicklung einer Eigenbeweglichkeit zu bestimmen, wurden zehn ausgewählte Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H⁻-Stämme mit dem unter 2.3 beschriebenen Verfahren untersucht. Die Zeitdauer in Tagen, die ein Stamm für das Durchwandern eines U-Röhrchens benötigte, wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum dokumentiert und wird im Folgenden "Passagezeit" genannt (Tab. 7-10).

Die kürzesten Passagezeiten in jeder der getesteten Agarkonzentrationen zeigte die Positiv-Kontrolle, der als beweglich bekannte Stamm EHEC O157:H7 03/250. Jedoch auch die untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ einschließlich des Kontroll-Stammes 493/89 entwickelten sichtbare Motilität. Diese war nach deskriptiven Kriterien eindeutig und regelhaft reproduzierbar. Die einzelnen Stämme unterschieden sich in der Geschwindigkeit, in der sie ein U-Röhrchen durchwanderten (Tab. 7-10). Mit zunehmender Agarkonzentration erhöhte sich die Passagezeit. In festem Agar mit 0,8% Agarkonzentration zeigte sich, dass nur noch zwei der zehn untersuchten Sorbitol-fermentierenden

O157:H⁻ sichtbare Beweglichkeit erreichten, nämlich die Stämme mit den Stammnummern 3072/96 und 2841/01. Alle anderen zeigten in dieser Konzentration über Beobachtungszeiträume von zehn Tagen keine Zeichen von Motilität (Tab. 10).

Tabelle 7 : Passagezeiten in Agar 0,2% (Tage)

Stamm	Median	Mittelwert
3072/96	3,0	2,7
340/97	2,5	2,7
3573/98	3,0	2,5
2584/99	5,0	4,7
2492/00	3,5	3,2
2841/01	3,0	3,1
129/02	4,0	3,8
813/02	2,0	2,9
E03/049	3,0	2,7
E03/053	2,0	2,5
493/89	4,0	3,6
03/250	1,0	1,0

Tabelle 8: Passagezeiten in Agar 0,4% (Tage)

Stamm	Median	Mittelwert
3072/96	3,0	3,4
340/97	5,0	5,2
3573/98	7,0	6,0
2584/99	8,5	8,5
2492/00	4,5	4,7
2841/01	3,0	4,1
129/02	6,0	6,0
813/02	6,0	5,3
E03/049	4,0	4,4
E03/053	4,5	4,8
493/89	4,5	4,5
03/250	1,0	1,0

Tabelle 9: Passagezeiten in Agar 0,6% (Tage)

Stamm	Median	Mittelwert
3072/96	3,0	4,1
340/97	5,5	5,5
3573/98	*	*
2584/99	*	*
2492/00	*	*
2841/01	7,0	5,4
129/02	5,0	4,7
813/02	4,0	3,7
E03/049	*	*
E03/053	4,0	5,7
493/89	*	*
03/250	1,0	1,2

* Keine sichtbare Beweglichkeit während des 10-tägigen Beobachtungszeitraums

Tabelle 10: Passagezeiten in Agar 0,8% (Tage)

Stamm	Median	Mittelwert
3072/96	4,0	4,3
340/97	*	*
3573/98	*	*
2584/99	*	*
2492/00	*	*
2841/01	7,0	7,0
129/02	*	*
813/02	*	*
E03/049	*	*
E03/053	*	*
493/89	*	*
03/250	1,0	1,2

* Keine sichtbare Beweglichkeit während des 10-tägigen Beobachtungszeitraums

3.4 Untersuchung auf Expression des H7-Antigens mittels Latexagglutinationstests

Die untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC, die in der funktionellen Analyse gute Motilität gezeigt hatten, wurden auf die Expression des H7-Antigens überprüft. Weiterhin wurden alle Stämme auf Vorhandensein des O157-Antigens getestet. Bei allen geprüften Stämmen ließ sich nach Kontakt mit dem H7-Antiserum eine deutliche Agglutination erkennen. Alle Stämme zeigten sich zudem O157-positiv. Als Kontrolle wurde der Sorbitol-fermentierende EHEC 493/89 direkt einer LB-Platte entnommen und mit H7-Antiserum vermischt. Hier zeigte sich keine Agglutination. (Tab. 11).

Tabelle 11: Untersuchung auf Vorhandensein des H-/O-Antigens ausgewählter Stämme nach Passage durch semisoliden Agar sowie einer Kontrolle (493/89) mittels Latexagglutinationstest

Stamm	Agar-Konzentration	Agglutination	
		Anti-H7	Anti-O157
E03/053	0,4% U-Röhrchen	positiv	positiv
2492/00	0,4% U-Röhrchen	positiv	positiv
340/97	0,4% U-Röhrchen	positiv	positiv
3072/96	0,8% U-Röhrchen	positiv	positiv
493/89	LB-Platte	negativ	n.u. ^a

^a n.u.: nicht untersucht

3.5 Elektronenmikroskopie

Zwei Stämme Sorbitol-fermentierender EHEC O157:H⁻ wurden in jeweils zwei Proben elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein typischer Flagellen untersucht. Eine der Proben enthielt Bakterienmaterial, das ohne Passage durch semisoliden Agar direkt von einer Agarplatte entnommen war, die zweite Probe enthielt jeweils Material nach Passage durch 0,8%igen Agar. In beiden Stämmen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Proben. Die Bakterien, die nicht einer Passage durch semisoliden Agar unterzogen worden waren, zeigten eine glatte Zellwand. Denjenigen, die nach Passage untersucht wurden, hafteten Organellen an, die morphologisch an Fimbrien und Pili erinnern (Abb. 3-6). Organellen, die morphologisch sicher Flagellen entsprechen, konnten mit dieser Technik nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 3: 3072/96 ohne Passage

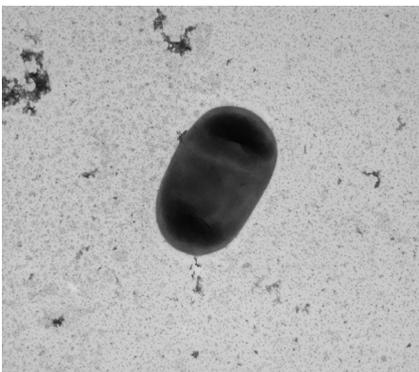


Abbildung 4: 3072/96 nach Passage

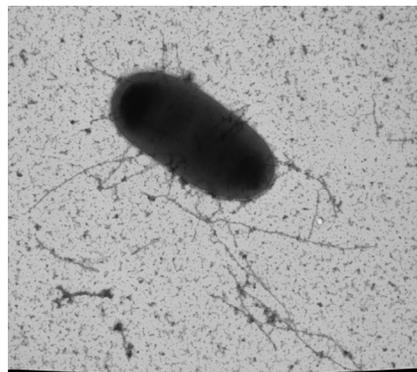


Abbildung 5: 2841/01 ohne Passage

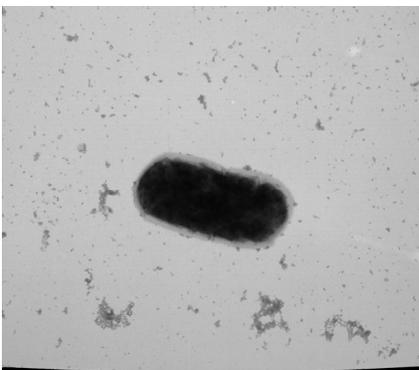
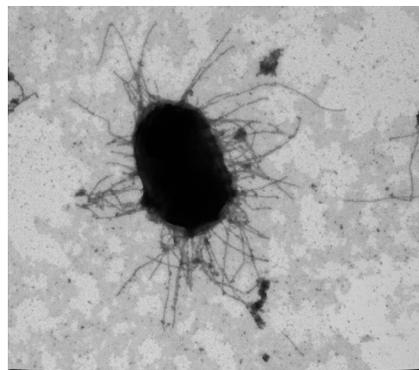
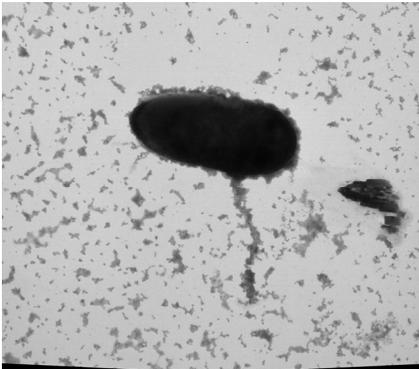


Abbildung 6: 2841/01 nach Passage



Der dritte untersuchte Stamm war ein EHEC O157:H7 Kontrollstamm nach Passage durch 0,8%igen Agar. Hier ist ein einzelnes Organell dargestellt, welches einem Pilus ähnelt (Abb. 7). Selbst bei diesem Stamm, der 0,8%igen Agar innerhalb eines Tages durchwanderte (Tab. 10), ließen sich mit der hier genutzten Technik keine Flagellen nachweisen.

Abbildung 7: 03/250 nach Passage



4 Diskussion

Innerhalb der Serogruppe O157 der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* war die Gruppe O157:H7 lange Zeit die am intensivsten untersuchte. In den Neunziger Jahren rückten jedoch aufgrund ihrer hohen Pathogenität Sorbitol-fermentierende Stämme der Serogruppe O157:H⁻ in den Mittelpunkt des Interesses. Unterschiede zeigen sich sowohl in phänotypischen als auch in genotypischen Charakteristika (11, 18). Namensgebend war die Fähigkeit der O157:H⁻, innerhalb von 24 Stunden in Nährmedien enthaltenes Sorbitol zu fermentieren. Auf SMAC-Agar wachsen sie als rote Kolonien. Auf den Zusatz von Tellurit im Nährmedium reagieren sie empfindlich, da sie im Gegensatz zu EHEC O157:H7 nicht über Telluritresistenz verfügen. Sorbitol-fermentierende EHEC O157:H⁻ gelten als unbeweglich und exprimieren kein H-Antigen. Es findet sich eine 12 bp umfassende Deletion im Regulatorgen *flhC*, die 2004 von Monday et al (26) beschrieben wurde, und als Erklärung für die Unfähigkeit dieser Stämme, funktionelle Flagellen zu produzieren, herangezogen wurde.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden ausgesuchte Stämme Sorbitol-fermentierender EHEC O157:H⁻ sowie der EHEC O157:H7 EDL 933, der als Kontrollstamm diente, auf ein Spektrum chromosomaler und plasmidkodierter Virulenzgene mittels PCR untersucht und im Hinblick auf Pathogenitätsfaktoren phänotypisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt und zeigen eine Kombination von Pathogenitätsmerkmalen, die für das jeweilige Serovar charakteristisch ist.

Vor der funktionellen Prüfung der Beweglichkeit wurde eine Untersuchung bekannter flagellinkodierender Gene in zehn Stämmen Sorbitol-fermentierender EHEC O157:H⁻ durchgeführt. Die Amplifikation des für die Hauptuntereinheit des Proteins Flagellin kodierenden Gens *fliC* erbrachte in allen untersuchten Stämmen ein Amplifikat der erwarteten Größe. Mit diesem wurde daraufhin eine Restriktionsfragmentlängenanalyse durchgeführt. Diese Untersuchung ergab ein Muster, das sich von dem des mituntersuchten EHEC O157:H7 EDL 933 nicht unterschied. Größere Mutationen in *fliC*, die eine Verschiebung des Leserahmens hervorrufen, sind somit unwahrscheinlich. Es ist folglich von dem Vorhandensein eines intakten *fliC* in den hier untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ auszugehen.

Im Weiteren wurde gezeigt, dass alle zehn untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ nicht über ein intaktes *flhC* verfügen. In einer in Anlehnung an Monday et al (26) konzipierten Multiplex-PCR-Analyse konnte dargestellt werden, dass sich die vorbeschrie-

bene Deletion mit hoher Wahrscheinlichkeit im *flhC*-Gen der untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ finden lässt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte eine funktionelle Analyse der Motilität der zehn ausgewählten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Motilität einiger Mikroorganismen durch wiederholte Passage durch flüssige und semi-solide Medien induzierbar ist (6). Dieses Verfahren wird im Rahmen der Motilitätsprüfung als tradierte funktionelle Analyse routinemäßig in vielen Laboratorien angewandt (s. Anhang).

Über einen Beobachtungszeitraum von insgesamt sieben Monaten wurden die bereits im Hinblick auf ihre molekularbiologischen Charakteristika untersuchten Stämme einer Motilitätsprüfung unterzogen. Hierzu wurden sie wiederholt in semisolidem Medium in aufsteigender Agarkonzentration inokuliert. Bei allen untersuchten Stämmen konnte eindeutiges Wachstum gesehen werden, welches den Kriterien von Motilität entsprach. Als Kontrolle wurde ein bekanntermaßen begeißelter und motiler Stamm der Serogruppe O157:H7 eingesetzt. Dieser übertraf die Sorbitol-fermentierenden Stämme konstant in der Geschwindigkeit, das Wachstumsmuster war jedoch identisch. In einer Agarkonzentration von 0,8% erreichten noch zwei Sorbitol-fermentierende Stämme die zuvor definierten Kriterien von Motilität, nämlich ein Durchwandern des U-Röhrchens binnen zehn Tagen. Der Stamm mit den besten Daten hatte die Stammnummer 3072/96. Dieser, sowie vier weitere Stämme wurden daraufhin den U-Röhrchen entnommen und einem Latexagglutinationstest mit H7-Antiserum unterzogen. In diesem Test konnte für die untersuchten Stämme die Expression des H7-Antigens nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurde der Stamm 493/89 direkt einer Agarplatte entnommen und ebenfalls mit H7-Antiserum versetzt. Hier zeigte sich kein Hinweis auf eine Expression des H7-Antigens.

In dieser Arbeit ließ sich in allen zehn untersuchten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ Motilität induzieren. Bei diesen Stämmen konnte eine Deletion im *flhC*-Gen nachgewiesen werden. Dies führt zu der Annahme, dass die beschriebene Deletion in diesen Stämmen die Entwicklung von Motilität nicht verhindert. Die von Monday et al 2004 publizierte Hypothese (26) scheint somit auf die in dieser Arbeit untersuchten Stämme nicht zuzutreffen.

Da des Weiteren mittels Latexagglutinationstest auch die Expression des H7-Antigens in den untersuchten Stämmen nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass Sorbitol-fermentierende EHEC O157 unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, Flagellen zu produzieren.

Mittels Elektronenmikroskopie konnten an den nun beweglichen Sorbitol-fermentierenden EHEC keine Organellen nachgewiesen werden, die morphologisch Flagellen entsprachen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Organismen, die nach Induktion von Motilität dargestellt wurden, über Organellen verfügten, die fimbrienartig die Zelle umgaben. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zu den Sorbitol-fermentierenden EHEC O157, die direkt einer Agarplatte entnommen wurden. Die Organismen, die keine Passage durch semisoliden Agar durchlaufen hatten, zeigten elektronenmikroskopisch eine glatte Zellwand.

Trotzdem es einige Hinweise auf die Induktion einer Flagellenbildung bei bislang H-negativen Sorbitol-fermentierenden EHEC mittels Passage durch semisoliden Agar gab, ließ sich das Vorhandensein von Flagellen im Rahmen dieser Arbeit nicht nachweisen. Die Tatsache, dass die motilisierten Sorbitol-fermentierenden EHEC O157 stets längere Passagezeiten zeigten als die der Serogruppe O157:H7, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die möglicherweise durch Induktion gebildeten Flagellen insuffizient waren oder nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung standen. Eine Beschädigung von Flagellen bei der Aufreinigung zur Elektronenmikroskopie ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, da sich selbst bei dem Kontrollstamm O157:H7 (03/250), der sicher beweglich ist und in der Lage war, 0,8%igen Agar binnen 24 h zu durchwandern, in dieser Technik mittels Elektronenmikroskopie keine Flagellen darstellen liessen. Möglicherweise ist die nachgewiesene Motilität bei mangelndem Nachweis funktioneller Flagellen auf eine flagellenunabhängige Beweglichkeit zurückzuführen. In der Literatur sind für andere gramnegative Organismen, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, die sog. „Twitching motility“, eine Typ IV-Fimbrien-assoziierte Beweglichkeit, beschrieben. Diese ist als Bewegungsmechanismus entlang solider Oberflächen bekannt, wurde jedoch bislang noch nicht als Fortbewegungsmodus in flüssigem oder semisolidem Medium nachgewiesen (21, 38). Zudem konnte in den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen die Expression des H7-Antigens gezeigt werden, was für das Vorhandensein von Flagellin spricht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Motilität und die Expression des H7-Antigens in Sorbitol-fermentierenden EHEC O157:H⁻ unter bestimmten Bedingungen auftreten kann. Demnach stellt sich die Frage, welche Faktoren für die Ausbildung von Motilität hier entscheidend sind. Im Umkehrschluss wäre zu erörtern, welche Faktoren die Einstellung von Motilität in Mikroorganismen bedingen. In der Literatur finden sich Erklärungsansätze, die eine Verminderung der Motilität mit einer Erhöhung der Pathogenität in Zusammenhang bringen (6). Hier könnte sich ein weiterer Ansatz zur Erklärung der hohen Pathogenität Sorbitol-fermentierender EHEC O157 verbergen.

5 Literaturverzeichnis

1. Bielaszewska, M, Schmidt, H, Liesegang, A, Prager, R, Rabsch, W, Tschäpe, 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
2. Bielaszewska, M, Tarr, P I, Karch, H, Zhang, W, Mathys, W (2005) Phenotypic and molecular analysis of tellurite resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and sorbitol-fermenting O157:NM clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43: 452-454
3. Bielaszewska, M, Sonntag, A-K, Schmidt, M A, Karch, H (2007) Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. *Microbes Infect* 9: 891-897
4. 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: 767-778
5. Brunder, W, Salam Khan, A, Hacker, J, Karch, H (2001) A novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻. *Infect Immun* 69: 4447-4457
6. Feng, P, Fields, P I, Swaminathan, B, Whittam, T S (1996) Characterization of nonmotile *Escherichia coli* O157 and other serotypes by using an antiflagellin monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 34: 2856-2859
7. Fields, P I, Blom, K, Hughes, H J, Hesel, L O, 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 *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM. *J Clin Microbiol* 35: 1066-1070
8. 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
9. Friedrich, A W, Köck, R, Bielaszewska, M, Zhang, W, Karch, H, Mathys, W (2005) Distribution of the urease gene cluster among and urease activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 isolates from humans. *J Clin Microbiol* 43: 546-550

10. Friedrich, A W, Lu, S, Bielaszewska, M, Prager, R, Bruns, P, Xu, J G, Tschäpe, H, Karch, H (2006) Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol* 44: 1844-1846
11. Griffin, P M, Tauxe, R V (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated haemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13: 60-98
12. 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
13. Janka, A, Bielaszewska, M, Dobrindt, U, Greune, L, Schmidt, M A, Karch, H (2003) The cytolethal distending toxin (*cdt*) gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 71: 3634-3638
14. Janka, A, Becker, G, Sonntag, A-K, Bielaszewska, M, Dobrindt, U, Karch, H (2005) Presence and characterization of a mosaic genomic island which distinguishes sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ from *E.coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 71: 4875-4878
15. Karch, H, Wiss, R, Gloning, H, Emmrich, P, Aleksic, S, Bockemühl, J (1990) Hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*. *Dtsch Med Wochenschr* 115: 485-495
16. Karch, H, Bielaszewska, M, Bitzan, M, Schmidt, H (1999) Epidemiology and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Microbiol Infect Dis* 34: 229-243
17. Karch, H, Bockemühl, J, Huppertz, H (2000) Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Dtsch Ärzteblatt* 97: 2314-2318
18. 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
19. Karmali, M A, Steele, B T, Petric, M, Lim, C (1983) Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet* 1: 619-620

20. Karmali, M A (2004) Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using shiga toxin receptor analogue. *J Infect Dis* 189: 355-359
21. Lautrop, H (1962) Bacterium anitratum transferred to the genus cytophaga. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 154: 303-304
22. Machado, J, Grimont, F, Grimont, P A (2000) Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res Microbiol* 151: 535-546
23. Macnab, R M (1996) Flagella and Motility. In: *Escherichia coli and salmonella*, 2.ed., Vol.1, ASM Press, Washington DC, 123-145
24. McDaniel, T K, Jarvis, K G, Donnenberg, M S, Kaper, J B (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 92: 1664-1668
25. Michino, H et al (1998) Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. In: Kaper, J B, O'Brien, J D, (Hrsg) *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga Toxin-producing *Escherichia coli*-strains. American Society for Microbiology, Washington, DC, 73-81
26. Monday, S R, Minnich, S A, Feng, P (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 Bact* 186: 2319-2327
27. Orth, D, Grif, K, Zimmerhackl, L B, Würzner, R (2008) Prevention and treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6: 101-108
28. Reid, S D, Selander, R K, Whittam, T S (1999) Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 153-169
29. Reida, P, Wolff, M, Pohls, H W, Kuhlmann, W, Lehmacher, A, Aleksic, S, Karch, H, Bockemühl, J (1994) An outbreak due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl Bakteriol* 281: 534-543
30. Renwick et al (1993) Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. *J Infect Dis* 168: 792-793
31. 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
32. Robert- Koch-Institut (2001) Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), Ratgeber für Infektionskrankheiten. Überarbeitete Fassung. Erstveröffentlichung in: Epidemiolog Bulletin 31/1999
33. Rüssmann, H, Schmidt, H, Heesemann, J, Caprioli, A, Karch, H (1994) Variants of shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with a haemolytic uremic syndrome. J Med Microbiol 40: 338-343
34. Schmidt, H, Rüssmann, H, Schwarzkopf, A, Aleksic, S, Heesemann, J, Karch, H (1994) Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 281: 201-213
35. Schmidt, H, Karch, H, Beutin, L (1994) The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *Escherichia coli* alpha-hemolysin family. FEMS Microbiol Lett 117: 189-96
36. 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
37. Schmidt, H, Maier, E, Karch, H, Benz, R (1996) Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Eur J Biochem 2: 594-601
38. Semmler, A B T, Whitchurch, C B, Mattick, J S (1999) A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol 145: 2863-2873
39. Taylor, D, Rooker, M, Keelen, M, Martin, I, Perna, N T, Burland, V, Blattner, F R (2002) Genome variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. J Bacteriol 184: 4690-4698
40. Toma, C, Martinez Espinosa, E, Song, T, Miliwebsky, E, Chinen, I, Iyoda, S, Iwanaga, M, Rivas, M (2004) Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 42: 4937-4946
41. Wang, L, Rothmund, D, Curd, H, Reeves P R (2003) Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-Antigen)-gene. J Bact 185: 2936-2943
42. Wohlgemuth, C, Hoiczky, E, Kaiser, D, Oster, G (2002) How myxobacteria glide. Curr Biol 12: 369-377

43. Zhang, W, Bielaszewska, M, Liesegang, A, Tschäpe, H, Schmidt, H, Bitzan, M, Karch, H (2000) Molecular characteristics and epidemiological significance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26. J Clin Microbiol 38: 2134-2140

Anhang

Traditionelle Methodik zur Bestimmung und Beurteilung von Motilität

"Die Prüfung der Beweglichkeit eines Bakterienisolates erfolgt durch Stichbeimpfung eines halbweichen (0,6%igen) Nähragars, den bewegliche Bakterien durchwachsen, während unbewegliche sich nur längs des Stichkanals vermehren."

Brandis, Eggers, Köhler, Pulverer: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, Verlag Gustav Fischer

Inokulation einer Kolonie aus einer Reinkultur in halbweichen Agar (0,8%) mit Glucose (0,1%) in ein U-Röhrchen. Inkubation bei 37°C über Nacht oder länger. Nicht bewegliche Stämme werden über mindestens 10 Tage beobachtet.

Fernmündliche Auskunft Robert Koch Institut, Standort Wernigerode

"In our laboratory, E. coli is inoculated in the media by stabbing the inoculation loop containing the bacteria straight down about 1/4th inch and turning the loop 45 degrees. The needle is pulled out. The tubes are incubated 37 degrees for 48 hours. Motility of the sample is inspected visually."

Dr.Chobi DebRoy, Director of Gastroenteric Disease Center, The Pennsylvania State University, PA, USA, via email
