



LGL

IV. EHEC-Workshop 2013

Wildbad Kreuth, 12.-14. Juni 2013

Für eine bessere Lesbarkeit haben wir bei manchen Personenbezeichnungen auf ein Ausschreiben der weiblichen Form verzichtet. Selbstverständlich sind in diesen Fällen Frauen und Männer gleichermaßen gemeint.

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

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Druck: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg
Stand: Mai 2013

Autorinnen und Autoren des Berichtes:
Alle Autoren sind namentlich im Manuskript gekennzeichnet.

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Ulrich Busch
Telefon: 09131 6808-5234
E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
alle Rechte vorbehalten

Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

ISBN 978-3-942018-83-8 Druckausgabe
ISBN 978-3-942018-84-5 Internetausgabe

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



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

Inhaltsverzeichnis

Grußwort des LGL- Präsidenten Dr. Andreas Zapf	4
Tagungsprogramm	6
Einführung, Vorwort.....	15
Festvortrag.....	17
Abstracts – Epidemiologie und Klinik	18
Abstracts – Nachweisverfahren und Diagnostik	24
Abstracts – EHEC und Lebensmittel	29
Abstracts – EHEC in Tier und Umwelt.....	33
Abstracts – Pathogene <i>E.coli</i>	36
Abstracts – Pathogenitätsfaktoren und Genomics.....	41
Abstracts – Poster.....	48
Referenten und Moderatorenverzeichnis.....	87

Grußwort des LGL- Präsidenten Dr. Andreas Zapf



Sehr geehrte Damen und Herren,
liebe Kolleginnen, liebe Kollegen,

Die Akademie für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (AGL) im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) veranstaltet gemeinsam mit den Fachgruppen „Gastrointestinale Infektionen“, „Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene“ und „Zoonosen“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) sowie der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), dem „Österreichischen Referenzzentrum und Referenzlabor für *E. coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*“ in Graz und dem Nationalen Zentrum für enteropathogene Bakterien (NENT) in Zürich den IV. EHEC-Workshop 2013 in Wildbad Kreuth.

Damit treffen sich zum vierten Mal zahlreiche Experten aus der Schweiz, Österreich und Deutschland in Wildbad Kreuth, um aus der Sicht der unterschiedlichen Fachdisziplinen die Problematik von EHEC-Infektionen zu diskutieren. Besonders werden die Aspekte Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Human- und Veterinärmedizin, Umwelt, Lebensmittel, Genomics und Pathogenitätsfaktoren behandelt und Lösungsmöglichkeiten für einen effektiven Infektionsschutz diskutiert.

Die Wichtigkeit einer interdisziplinären Herangehensweise im Sinne eines One Health-Ansatzes, der neben der Human- und Veterinärmedizin auch Umwelt- und Lebensmittelaspekte mit umfasst, wurde nicht zuletzt durch den bislang weltweit größten EHEC-Ausbruch im Frühsommer 2011 uns allen vor Augen geführt. Nur durch gemeinsame Anstrengungen zahlreicher z.T. auch hier beim IV. EHEC-Workshop vertretener Institutionen konnte der O104:H4-Ausbruch aufgeklärt und wirkungsvoll bekämpft werden. Bei der Ausbruchsbekämpfung spielten die unterschiedlichen Fachexpertisen und die effektive Zusammenarbeit der beteiligten Akteure auf den unterschiedlichen Ebenen – regional, national und international - eine zentrale Rolle.

Das Programm des IV. EHEC-Workshops 2013 reflektiert die beim EHEC-Ausbruch 2011 erneut gewonnenen Erfahrungen in die Notwendigkeit sektoren-, ebenen- und disziplin-übergreifender Lösungsansätze

Durch diese Herangehensweise ist die Veranstaltung geradezu prädestiniert, den Öffentlichen Gesundheitsdienst in seinen wissenschaftsbasierten Managementaufgaben zu unterstützen und in seiner zwischen Wissenschaft, Politik und Öffentlichkeit angesiedelten Aufgabenstellung zu stärken. Neue Programmangebote, wie z.B. ein Diskussionsforum oder ein erstmalig im Programm aufgenommener Workshop geben die Möglichkeit, aktuelle Fragestellungen der verbesserten molekularepidemiologischen EHEC-Surveillance in Deutschland oder des evidenzbasierten Managements von EHEC-Ausscheidern noch intensiver zu diskutieren. Die gewonnenen Einsichten sollen als fachliche Grundlage für weitere Abstimmungen innerhalb Bayerns und der Bundesrepublik Deutschland dienen.

Für den IV. EHEC-Workshop 2013 in Wildbad Kreuth wünsche ich uns allen eine fachlich interessante, erfolgreiche und angenehme Tagung sowie viele interessante und anregende Gespräche.

Erlangen, im Mai 2013



Dr. Andreas Zapf

*Präsident des Bayerischen Landesamtes
für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit*

Tagungsprogramm

Mittwoch, 12. Juni 2013

ab 17⁰⁰ Anreise, Anmeldung

ab 18³⁰ Begrüßung

Grußwort.

Dr. A. Zapf, Präsident LGL

19⁰⁰ - 20⁰⁰ Festvortrag

EHEC in Europa

A. Ammon, ECDC, Stockholm

anschließend gemütliches Beisammensein

Donnerstag, 13. Juni 2013

Epidemiologie

Vorsitz: *W. Hautmann, D. Werber*

9⁰⁰ - 9²⁰ Großer Ausbruch von Gastroenteritis und hämolytisch-urämischem Syndrom durch EHEC O104:H4, 2011, Norddeutschland - Deskription und Suche nach der Infektionsquelle

C. Frank, Berlin

9²⁰ - 9⁴⁰ Zwei analytisch-epidemiologische Studien unter Verwendung von Daten aus dem Herstellungs- und Abrechnungsprozess als wertvolle Ermittlungswerkzeuge während des EHEC/HUS-Ausbruchs 2011

H. Wilking et al., Berlin

9⁴⁰ - 10⁰⁰ Phylogenie, klonale Struktur und Krankheitsassoziation von *stx2a*-positiven EHEC O26 in Deutschland, 1996-2012

M. Bielaszewska et al., Münster

10⁰⁰ - 10²⁰ Bevölkerungsbasierte Evidenz für eine außerordentliche Virulenz der STEC-Serogruppe O157

K. Preußel et al., Berlin

10²⁰ - 10³⁰ Diskussion

10³⁰ - 11⁰⁰ Kaffeepause

Podiumsdiskussion

Vorsitz: *A. Sing, D. Werber*

- 11³⁰ - 12³⁰ Podiumsdiskussion:
Routinediagnostik von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC)
PD Dr. D. Werber, RKI Berlin,
Dr. A. Fruth, RKI Wernigerode,
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Karch, Universität Münster,
Prof. Dr. Dr. A. Sing, LGL Oberschleißheim,
PD Dr. F. Stelter, Labor Schottdorf, Augsburg,
Dr. H. Stefanowski, BÄMI

12³⁰ - 14⁰⁰ Mittagspause

Nachweisverfahren und Diagnostik

Vorsitz: *V. Hingst, A. Fruth*

- 14⁰⁰ - 14²⁰ New nomenclature of Shigatoxins and application of a sequence-based protocol for its detection
R. Stephan, Zürich
- 14²⁰ - 14⁴⁵ HUS-assoziierte *E. coli* (HUSEC)
H. Karch et al., Münster
- 14⁴⁵ - 15⁰⁰ Evaluierung phagenprotein-basierter Nachweissysteme zur Diagnostik von *E. coli* O26, O103, O111, O121, O145 und O157
S. Molinaro et al., Bernried
- 15⁰⁰ - 15¹⁵ Fast microarray-based DNA-serogenotyping of *Escherichia coli*
L. Geue et al., Wusterhausen
- 15¹⁵ - 15³⁰ Diskussion

EHEC und Lebensmittel

Vorsitz: *H. Schmidt, R. Stephan*

- 15³⁰ - 15⁴⁵ Die Task Force EHEC als Beispiel eines zentralen Instruments im bundesweiten Krisenmanagement
B. Müller et al., Oberschleißheim
- 15⁴⁵ - 16⁰⁰ Molekularbiologische Untersuchung des Subtilase Zytotoxins von STEC
J. Funk et al., Hohenheim
- 16⁰⁰ - 16¹⁵ Untersuchungen zur Tenazität von *E. coli* O104:H4
C. Böhnlein et al., Kulmbach
- 16¹⁵ - 16³⁰ Diskussion
- 16³⁰ - 17⁰⁰ Kaffeepause

EHEC in Tier und Umwelt

Vorsitz: *R. Bauernfeind, L. Wieler*

- 17⁰⁰ - 17¹⁵ Einfluss kraftfutterreicher Fütterung beim Rind auf die Ausscheidung von *E. coli*, insbesondere von STEC
L. Geue et al., Wusterhausen
- 17¹⁵ - 17³⁰ Vergleichende Studien an Verotoxin- bildenden *Escherichia coli* (VTEC) der Serogruppen O27, O91 und O113 aus Human-, Tier- und Lebensmittelproben
S. Schlager et al., Graz
- 17³⁰ - 17⁴⁵ Diskussion
- 17⁴⁵ - 18⁰⁰ Verleihung der Posterpreise
- ab 20⁰⁰ Abendprogramm

Freitag, 14. Juni 2013

Pathogene *E. coli*

Vorsitz: R. Würzner, H. Hächler

8³⁰ - 8⁵⁰ Transduktion des atypischen enteropathogenen *E. coli* (aEPEC) IMT19981 (O26:H-, ST21) mit einem Shiga Toxin-konvertierenden Bakteriophagen – Die Rolle von aEPEC als Pre-EHEC

I. Eichhorn et al., Berlin

8⁵⁰ - 9¹⁰ Genotypisierung enteroaggregativer *Escherichia coli* (EAEC)

C. Dracopoulos et al., Lübeck

9¹⁰ - 9³⁰ Auswirkungen einer antibiotischen Therapie auf die Pathogenität von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* O104:H4 in vitro

U. Lindner et al., Lübeck

9³⁰ - 9⁴⁵ Diskussion

9⁴⁵ - 10¹⁵ Kaffeepause

Pathogenitätsfaktoren und Genomics

Vorsitz: S. Schlager, H. Karch

10¹⁵ - 10⁴⁰ Inhibition der Schutzfunktion des Komplementsystems durch Interferenz von Shigatoxin mit löslichen Komplementfaktoren

R. Würzner et al., Innsbruck

10⁴⁰ - 11⁰⁰ Inhibition der Schutzfunktion des Komplementsystems durch Shigatoxin-induzierte Herabregulation membranständiger Komplementregulatoren

D. Orth-Höller et al., Innsbruck

11⁰⁰ - 11²⁰ Status quo der Shigatoxin-Rezeptorforschung: humane mikrovaskuläre Endothelzellen im Fokus

J. Müthing et al., Münster

11²⁰ - 11³⁰ Diskussion

Workshop Freitag 14.06.2013

W. Hautmann, D. Werber

Umsetzung Infektionsschutzgesetz: Umgang mit Personen, die EHEC/STEC über eine längere Zeit ausscheiden

Dr. W. Hautmann, LGL Oberschleißheim;

PD Dr. D. Werber, RKI Berlin;

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Karch, Universität Münster;

Dr. M. Pulz, LGA Hannover;

Prof. Dr. G. Peters, Universität Münster;

Vertreter von Gesundheitsämtern

Pathogenitätsfaktoren und Genomics

Vorsitz: *D. Orth-Höller, S. Barth*

11³⁰ - 11⁵⁰ Die Expression spezifischer Glykosyltransferasen und der Gehalt an Shiga Toxin-bindenden Glykosphingolipiden bestimmen die Toxinsensitivität von humanen lymphoiden und myeloiden Zellen

I. Kouzel et al., Münster

11⁵⁰ - 12¹⁰ Expression des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG in Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*-Stämmen

T. Kuczius et al., Münster

12¹⁰ - 12³⁰ SNP-Typisierung und Krankheitsassoziation von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O26:H11/H-

S. Bletz et al., Münster

12³⁰ - 12⁴⁵ Diskussion und Abschluss der Tagung

12⁴⁵ - 14⁰⁰ Mittagessen

Posterpräsentationen

Epidemiologie und Klinik

Post-Ausbruchs-Surveillance für sporadische Fälle von Infektionen mit EHEC O104:H4 in Deutschland, 04. Juli bis 31. Dezember 2011

C. Frank et al., Berlin

Antibiotika-Resistenzen bei EHEC O26, O91 und O111

A. Kossow et al., München

Neonatal hemolytic uremic syndrome after mother-to-child transmission of a low virulent *stx2b* harbouring Shigatoxin producing *Escherichia coli*

H. Hächler et al., Zürich

LGL-EHEC-Laborbefunde und Bayerische EHEC-Meldedaten 2012. Wie bilden sich die Befunde in der Meldedatenbank ab?

R. Konrad et al., Oberschleißheim

EHEC notifications in the background of the EHEC/EAEC O104:H4 outbreak in 2011 in Germany and further differentiation of the isolates

A. Fruth et al., Wernigerode

Nachweisverfahren und Diagnostik

Charakterisierung Shiga Toxin-produzierender *E. coli* Isolate aus Urinproben von Patienten mit nosokomialen Harnwegsinfektionen

U. Dobrindt et al., Münster

Einfluss endokrin wirksamer Substanzen auf die Transkription von Shiga Toxin Genen

W. Zhang et al., Münster

Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität eines immunchromatografischen Schnelltests zum Nachweis von Shigatoxin 1 und/oder Shigatoxin 2 aus humanen Stuhlproben

S. Neubauer et al., Graz

A molecular based *E. coli* serotyping system using oligonucleotide microarrays

G. Weissensteiner et al., Graz

Unterscheidung von *E. coli* auf Ebene der O-Antigene mittels Infrarotspektroskopie

N. Mauder, Stuttgart

Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of Shiga toxin 1 and 2 gene subtypes

R. Stephan et al., Zürich

Etablierung einer Multiplex Real-Time PCR zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157

H. Adam et al., Oberschleißheim

Optimierung der Kolonieblot-Hybridisierung zum simultanen Nachweis von Shigatoxin 1 /*stx1* und 2 /*stx2* bei EHEC

I. Huber et al., Oberschleißheim

Untersuchungen zum Nachweis von HUSEC 41 (*E. coli* Serovar O104:H4) aus Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs

F. Düker et al., Gießen

EHEC und Lebensmittel

Überleben von STEC O26-Isolaten in Rohwurstprodukten

R. Pichner et al., Kulmbach

Fate of Shiga toxin-producing and generic *E. coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese

J. Hummerjohann et al., Bern

Validation and application of real-time PCR screening for the most pathogenic STEC groups in raw mild cheese

J. Hummerjohann et al., Bern

Crossing Borders and Crossing Disciplines: Expertenworkshop und Krisenseminar zum Ausbruch eines zoonotischen Infektionserregers in der deutsch-niederländischen Grenzregion

R. Schmithausen et al., Bonn

Vergleich von STEC-Isolaten aus Lebensmitteln mit humanen HUSEC-Stämmen

E. Hauser et al., Stuttgart

EHEC in Tier und Umwelt

Überleben von *E. coli* O104:H4 und O157:H7 in Oberflächenwasser

A. Martin et al., Berlin

Shiga toxin subtypes associated with Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains isolated from hunted red deer, roe deer, chamois and ibex in Switzerland

R. Stephan et al., Zürich

Pathogene *E.coli*

Klonale Verwandtschaft enteroaggregativer *E. coli* in Sachsen

S. Hauswaldt et al., Lübeck

Case of urinary tract infection and sepsis caused by enteroaggregative *E. coli* after diarrhea

M. Nüesch-Interbinen et al., Zürich

Prüfung einer rekombinanten Stx2e-Toxoidvakzine in Feldversuchen am Zieltier Schwein

O. Bastert et al., Dessau-Roßlau

Vorkommen und Virulenz-Charakterisierung von *E. coli* EHEC/EAEC Hybrid-Pathovaren in Deutschland 2008-2011

R. Prager et al., Wernigerode

Pathogenitätsfaktoren und Genomics

Instabilität des pAA-Virulenzplasmids im *E. coli* O104:H4-Ausbruchsstamm 2011

L. Kunsmann et al., Münster

Sensitivitätsunterschiede von mikro- und makrovaskulären Endothelzelllinien auf Shiga Toxin 1 und Shiga Toxin 2

A. Bauwens et al., Münster

Antitumor-Aktivität von Shiga Toxin gegenüber Gb3Cer/CD77-exprimierenden humanen Karzinomzelllinien des Pankreas

G. Pohlentz et al., Münster

Interaktion von Shiga Toxin 2e mit Glykosphingolipid-Rezeptoren porciner Endothelzellen:
Modell für die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke

I. Meisen et al., Münster

Strukturaufklärung der Shiga Toxin-Rezeptoren von Verozellen und Expressionsanalyse der
Rezeptor-relevanten Glykosyltransferasen

C.-L. Schepers et al., Münster

Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin-Rezeptoren humaner
Nierendothelzellen mit ungewöhnlicher molekularer Anordnung in der Zellmembran

M. Mormann et al., Münster

Identifizierung der Substratbindungsdomänen des Typ III Effektorproteins NleD

K. Creuzburg, Melbourne

Human plasmatic coagulation is significantly impaired by EHEC-derived Shiga toxin 2

M. Berktold et al., Innsbruck

Comparative analysis of wildtype ESBL- E.coli strains and their plasmid-cured variants (PCV)

K. Schaufler et al., Berlin

Einführung, Vorwort

Dr. Ulrich Busch

Liebe Kolleginnen und Kollegen, sehr geehrte Damen und Herren, wie bereits 2004, 2007 und 2010 ist es mir eine große Freude, Sie wieder in Wildbad Kreuth begrüßen zu dürfen. Damit hat sich Wildbad Kreuth endgültig als Tagungsort für den EHEC-Workshop etabliert. Wie wichtig der EHEC-Workshop als interdisziplinäre Plattform für Wissenschaft, Behörden und Industrie ist, hat sich besonders in der sogenannten „EHEC-Krise“ 2011 gezeigt, wo während des Ausbruchgeschehens 22 HUS und 256 EHEC-Fälle in Bayern gemeldet wurden, was etwa der sechs- bis siebenfachen Zahl an Fällen entsprach, die durchschnittlich zu erwarten gewesen wären. Durch die intensive Zusammenarbeit der betroffenen Institutionen ist es gelungen, Sprossen als Auslöser des EHEC-Ausbruchs zu ermitteln und den Ausbruch damit erfolgreich aufzuklären. Der ermittelte Serotyp O104 H4 spielt seither wieder eine untergeordnete Rolle. Während des Ausbruchs hat sich aber besonders deutlich gezeigt, welche Rolle eine effiziente Diagnostik spielt und welche Parameter auf jeden Fall in der Diagnostik erhoben werden müssen. Da die aktuelle Primärdiagnostik von STEC-Infektionen nur bedingt geeignet ist, haben wir diese Problematik im IV. EHEC Workshop aufgegriffen und veranstalten eine Podiumsdiskussion zum Thema: „Routinediagnostik von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC)“. Als ein Ziel der Veranstaltung sollen die Grundlagen für ein Konsensus Papier entwickelt und damit Empfehlungen für die Diagnostik ausgesprochen werden. Ob dies dann als sogenannte „Kreuther Erklärung“ publiziert werden kann, wird sich noch zeigen.

Als Zweite Neuerung wird beim IV. EHEC Workshop in einer eigenen Veranstaltung über die Umsetzung des Infektionsschutzgesetzes diskutiert werden, im Speziellen über den Umgang mit Personen, die über eine längere Zeit STEC ausscheiden. Hier sollen vor allem die Problematik der beruflichen Tätigkeiten in Gemeinschaftseinrichtungen bzw. der Umgang mit Lebensmitteln im Mittelpunkt stehen. Da in der Praxis konkrete Empfehlungen oder Kriterien für die Entscheidung fehlen, ist eine sehr interessante Diskussion zu erwarten. Dabei soll auch hier die Veranstaltung zum Anlass genommen werden, um ein Konsensuspapier zu erarbeiten und mit allen interessierten Kreisen abzustimmen.

Als Grundlage des Erfolgs der Veranstaltung sind auch beim IV. Workshop wieder alle nationalen Referenzzentren aus Deutschland - mit dem Nationalen Referenzzentrum für

Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger in Wernigerode des RKI, dem Nationalen Referenzlabor für *Escherichia coli* des BfR, dem Konsiliarlabor für HUS der Universität Münster, aus Österreich mit den Referenzzentren für EHEC in Graz und der Schweiz mit dem Zentrum für enteropathogenen Bakterien in Zürich aktiv an der Vorbereitung und der Durchführung des Workshops beteiligt, wofür ich mich schon einmal recht herzlich bedanken möchte.

Eine solche Veranstaltung ist nicht möglich, ohne die zahlreichen helfenden Hände im Hintergrund. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Gallersdörfer von der Akademie für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit bedanken, die sich mit außerordentlichem Engagement um die Vorbereitung und Durchführung der Tagung gekümmert hat. Weiterhin geht mein Dank an meine Sekretärin Frau Lange, die sich in geduldvoller Kleinarbeit um die Erstellung des Programms gekümmert hat. Frau Dr. Angelika Fruth vom RKI in Wernigerode, danke ich sehr für die konstruktive und schnelle Unterstützung bei der Erstellung des Programms und des Tagungsbandes.

Ich wünsche uns allen eine spannende und erkenntnisreiche Tagung in Wildbad Kreuth und sehe auch das Rahmenprogramm als gelungenen Beitrag, um die Veranstaltung auch in diesem Jahre wieder erfolgreich durchführen zu können.

Festvortrag

EHEC in Europa

Andrea Ammon

Institut für European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)

Tomtebodavägen 11A, S – 17183 Stockholm

A

Abstracts – Epidemiologie und Klinik

- I. Großer Ausbruch von Gastroenteritis und hämolytisch-urämischem Syndrom durch EHEC O104:H4, 2011, Norddeutschland - Deskription und Suche nach der Infektionsquelle
C. Frank, Berlin
- II. Zwei analytisch-epidemiologische Studien unter Verwendung von Daten aus dem Herstellungs- und Abrechnungsprozess als wertvolle Ermittlungswerkzeuge während des EHEC/HUS-Ausbruchs 2011
H. Wilking et al., Berlin
- III. Phylogenie, klonale Struktur und Krankheitsassoziation von *stx2a*-positiven EHEC O26 in Deutschland, 1996-2012
M. Bielaszewska et al., Münster
- IV. Bevölkerungsbasierte Evidenz für eine außerordentliche Virulenz der STEC-Serogruppe O157
K. Preußel et al., Berlin

I.

Großer Ausbruch von Gastroenteritis und hämolytisch-urämischem Syndrom durch EHEC O104:H4, 2011, Norddeutschland – Deskription und Suche nach der Infektionsquelle

Christina Frank stellvertretend für das RKI-Ausbruchsteam (Robert Koch-Institut)

Korrespondenzadresse: Christina Frank, RKI-FG35, DGZ-Ring 1, 13086 Berlin

Keywords: EHEC, STEC, O104, HUS, Ausbruch

Von Mai bis Juli 2011 kam es vor allem in Norddeutschland zu einem großen Ausbruch von Gastroenteritis und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) vom Serotyp O104:H4. Dies ist weltweit der mit Abstand größte beschriebene EHEC-Ausbruch in Bezug auf die Anzahl der HUS-Erkrankungen. Der Krankheitsausbruch begann Anfang Mai 2011, hatte am 22.5.2011 seinen Gipfel und wurde mit dem 4.7.2011 für beendet erklärt. Mit Datenstand vom 1.3.2012 wurden 827 Erkrankungen an enteropathischem HUS und 2.966 Fälle von akuter EHEC-Gastroenteritis als zum Ausbruch zugehörig betrachtet. Unter den HUS-Patienten verstarben 35 (4,2%) und unter den EHEC-Patienten mit Gastroenteritis 18 (0,6%). Der Anteil der Frauen überwog sowohl bei den HUS-Fällen (570, 69%) als auch bei den EHEC-Fällen (1.724, 58%). Bei den Erkrankten handelte es sich überwiegend um Erwachsene (88% bei HUS, 89% bei EHEC). Der Altersmedian der HUS-Erkrankten betrug 43 Jahre, die der Patienten mit EHEC-Gastroenteritis 46 Jahre. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den in den Meldedaten beobachteten Fällen von EHEC-Gastroenteritis und HUS der letzten Jahre, als vor allem Kleinkinder betroffen waren. International wurden 137 Erkrankungsfälle (darunter 54 HUS) in 15 Staaten innerhalb und außerhalb der EU bekannt, die dem Ausbruch zugeordnet wurden. Es handelte sich um Personen, die sich im Ausbruchszeitraum in Deutschland infiziert hatten. Der sehr seltene Krankheitserreger weist Virulenzeigenschaften sowohl von EHEC als auch von EAEC auf und war vor 2011 nicht als ein mit Ausbrüchen assoziierter EHEC-Serotyp bekannt.

Ab dem 20.5.2011 untersuchte das RKI in Zusammenarbeit mit Gesundheits- und Lebensmittelbehörden des Bundes, der Länder und der Kreise diesen Krankheitsausbruch. Das wahrscheinliche Infektionsvehikel konnte durch eine Serie von epidemiologischen Studien als Bockshornkleesprossen identifiziert werden. Eine große Herausforderung war hierbei die außergewöhnlich lange Inkubationszeit (im Median: 8 Tage), sowie die schlechte Erinnerbarkeit von Sprossenverzehr, da diese häufig Bestandteil von gemischten Salaten oder Menuverzierungen waren. Starke epidemiologische Evidenz für das verdächtige Lebensmittel lieferte v.a. eine rezeptbasierte Restaurant-Kohortenstudie, wo Studienteilnehmer sich lediglich an das gewählte Essen – nicht an die Zutaten – erinnern mussten. Ein lokaler Ausbruch verursacht durch EHEC 104:H4 im Juni 2011 in Frankreich trug ebenfalls zur Vehikel-Identifizierung bei, da auch hier Bockshornklee-Sprossen als wahrscheinliches Infektionsvehikel identifiziert werden konnten. Die Rückverfolgung der in Deutschland und Frankreich implizierten Sprossensamen ergab, dass die Samen jeweils von einem deutschen Großhändler bezogen worden waren, der die entsprechende Charge aus Ägypten importiert hatte.

II.

Zwei analytisch-epidemiologische Studien unter Verwendung von Daten aus dem Herstellungs- und Abrechnungsprozess als wertvolle Ermittlungswerkzeuge während des EHEC/HUS-Ausbruchs 2011

Hendrik Wilking^{1*}, René Gottschalk², Udo Götsch², Merle M. Böhmer¹, Cornelius Remschmidt¹, Yvonne Deleré¹, Matthias an der Heiden¹, Christina Frank¹, Klaus Stark¹, Gérard Krause¹, Udo Buchholz¹

¹ Robert Koch-Institut, ² Gesundheitsamt Frankfurt, * Robert Koch-Institut, DGZ-Ring 1, 13086 Berlin
e-Mail: WilkingH@rki.de

Keywords: EHEC, HUS, Outbreak, Epidemiological Studies, Sprouts

Deutschland war 2011 von einem großen Ausbruch von Durchfall und HUS, verursacht durch EHEC vom Serotyp O104:H4 betroffen. Wesentliche Besonderheiten des Ausbruchs waren der Zusammenhang mit einer längeren Inkubationszeit und damit ein länger zurückliegender Expositionszeitraum. Während des Ausbruchs konnte ermittelt werden, dass einige gastronomische Betriebe mit dem Vorkommen von Erkrankungen in Beziehung gebracht werden konnten. Im Vortrag werden zwei Studien in Frankfurt (Main) und Lübeck präsentiert, die zur Eingrenzung und Identifizierung des Ausbruchs-Vehikels geführt haben.

Die Studie in Frankfurt war eine Fall-Kontroll-Studie basierend auf Daten eines obligatorischen, bargeldlosen Kantinen-Bezahlsystems [1]. In der Kohortenstudie in Lübeck wurde der Küchenchef eines Restaurants bezüglich seiner für die jeweiligen Gerichte eingesetzten Zutaten befragt und anschließend Besuchergruppen nach ihrem Krankheitsstatus und dem Namen des bestellten Gerichtes (rezeptbasierte Kohortenstudie) [2].

In Frankfurt wurde der Einkauf an der Salatbar als einziger Risikofaktor identifiziert (Odds ratio: 6,6; 95%-KI: 1,4-31,4) und in Lübeck die Bestellung von Gerichten mit rohen Sprossen (Relatives Risiko: 14,2; 95%-KI: 2,6-∞). In dieser Studie konnten alle 31 Patienten mit dem Konsum von Sprossen erklärt werden. Andere Zutaten blieben unauffällig.

Diese Studien mit größtmöglicher Unabhängigkeit vom Erinnerungsvermögen der Studienteilnehmer konnten Misklassifizierung reduzieren und so das Ausbruchsvehikel eingrenzen und identifizieren. Obwohl das Ausbruchsvehikel von vielen Betroffenen nicht bewusst verzehrt wurde, konnte es mit den eingesetzten Methoden gut erfasst werden. Bei Ausbrüchen sollten Gesundheitsbehörden analytisch-epidemiologische Studien unter Verwendung von Datenquellen aus dem Herstellungs-, oder Abrechnungsprozess von Lebensmitteln in Erwägung ziehen.

[1] Wilking H, Götsch U, Meier H, Thiele D, Askar M, Dehnert M, Frank C, Fruth A, Krause G, Prager R, Stark K, Böddinghaus B, Bellinger O, Gottschalk R. Identifying risk factors for shiga toxin-producing *Escherichia coli* by payment information. *Emerg Infect Dis.* 2012 Jan;18(1):169-70.

[2] Buchholz U, Bernard H, Werber D, Böhmer MM, Remschmidt C, Wilking H, Deleré Y, an der Heiden M, Adlhoch C, Dreesman J, Ehlers J, Ethelberg S, Faber M, Frank C, Fricke G, Greiner M, Höhle M, Ivarsson S, Jark U, Kirchner M, Koch J, Krause G, Lubert P, Rosner B, Stark K, Kühne M. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med.* 2011 Nov 10;365(19):1763-70.

III.

Phylogenie, klonale Struktur und Krankheitsassoziation von *stx*_{2a}-positiven EHEC O26 in Deutschland, 1996–2012

Martina Bielaszewska¹, Alexander Mellmann¹, Stefan Bletz¹, Wenlan Zhang¹, Robin Köck¹, Annelene Kossow¹, Lisa Kunsmann¹, Andreas Bauwens¹, Rita Prager², Angelika Fruth², Helge Karch¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

² Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Burgstraße 37, D-38855 Wernigerode
e-Mail: mbiela@uni-muenster.de

Keywords: EHEC O26, Shiga-Toxin, Multilocussequenztypisierung, Plasmidgenprofil, neuer O26 Klon

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) der Serogruppe O26 zählen zu den häufigsten non-O157 EHEC-Erregern bei humanen Erkrankungen weltweit. Neben den häufig detektierten, nur *stx*_{1a}-positiven Stämmen wurden seit der Mitte der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts zunehmend *stx*_{2a}-positive EHEC O26 in Deutschland nachgewiesen. Der häufige Nachweis dieser Stämme bei schweren Erkrankungsverläufen wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) deutet auf besondere Virulenzeigenschaften dieses Klon hin. Da jedoch keine ausreichenden Daten hierzu vorliegen, haben wir 86 *stx*_{2a}-positive EHEC O26:H11/H⁻ (unbeweglich) Stämme, die zwischen 1996 und 2012 in Deutschland aus humanen Proben isoliert wurden, hinsichtlich ihrer molekularen Eigenschaften, Phylogenie, klonalen Struktur und Krankheitsassoziation untersucht. Alle 86 Stämme hatten *fliC*_{H11} und den *eae*- β -Subtyp, 95% der Stämme trugen das EHEC-*hlyA* Gen und zeigten einen enterohämolytischen Phänotyp. Die Multilocussequenztypisierung (MLST) ergab zwei große phylogenetische Gruppen, die durch die MLST Sequenztypen (ST) ST21 und ST29 definiert wurden. Alle Stämme mit ST29 waren, basierend auf ihren Pulsfeld-Gelelektrophorese-Mustern, sehr nah verwandt untereinander und hatten ein typisches Plasmidgenprofil (EHEC-*hlyA*+, *katP*-, *espP*-, *etpD*+), welches zu dem des neuen *stx*_{2a}-positiven O26 Klon aus den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts korrespondierte und nicht in ST21 Stämmen zu finden war. Beide, ST29 und ST21 Stämme waren signifikant häufiger mit HUS als mit unkomplizierter Diarrhö assoziiert ($P < 0.05$). Zusammenfassend belegen diese Daten, dass sich der neue EHEC O26 Klon erfolgreich in Deutschland ausbreiten konnte.

IV.

Bevölkerungsbasierte Evidenz für eine außerordentliche Virulenz der STEC-Serogruppe O157

Karina Preußel, Michael Höhle, Klaus Stark, Dirk Werber*

Robert Koch-Institut, Abt. für Infektionsepidemiologie, FG für gastrointestinale Infektionen, Zoonosen und tropische Infektionen

** e-Mail: PreusselK@rki.de*

Keywords: Shigatoxin-produzierenden *E. coli*, Serogruppe, Virulenz, *E. coli* O157

Das klinische Bild von Infektionen mit Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC) ist sehr variabel und reicht von selbstlimitierenden Durchfallerkrankungen bis hin zu schweren hämorrhagischen Kolitiden oder dem lebensbedrohlichen hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS). Insbesondere STEC der Serogruppe O157 verursachen schwere Krankheitsverläufe und sind global wohl die häufigste Ursache für pädiatrische STEC-assoziierte HUS. Für STEC O157 wird zudem anhand der Prävalenz detektierter Virulenzfaktoren eine höhere Virulenz im Vergleich zu anderen Serogruppen angenommen. Eine bevölkerungsbasierte Studie zur Überprüfung der Virulenz relevanter STEC Serogruppen fehlt jedoch bislang.

Ziel war deshalb der Vergleich spezifischer Hospitalisierungs- und Mortalitätsrisiken als Virulenzmaße für die in Deutschland häufigsten Serogruppen (O157, O104, O26, O103, O91, O145, O128, O111) auf Basis von Surveillancedaten gemäß Infektionsschutzgesetz. Relative Risiken (RR) wurden mittels Poisson-Regression mit robustem Fehlerschätzer berechnet.

Zwischen 2004 - 2011 wurden 12587 Fälle gastroenteritischer STEC-Erkrankungen (Meldekategorie EHEC) und STEC-assoziiertem HUS gemeldet und an das RKI übermittelt. Von der weiteren Analyse wurden sowohl nosokomiale Fälle ausgeschlossen als auch Fälle ohne vorliegende O-Antigen-Information in 2011, die zu einem überwiegenden Teil epidemiologisch dem O104-Ausbruch zugeordnet werden. Somit wurden insgesamt 8400 Fälle in die Analyse eingeschlossen. Davon waren 2454 Fälle hospitalisiert (29,2%), 30 Fälle (0,4%) verstarben.

Für 51,5% der Fälle lag eine Serogruppeninformation vor. Am häufigsten wurden Infektionen mit STEC O104 berichtet, die alle dem Ausbruch in 2011 zuzuordnen sind. Daneben war STEC O157 die am häufigsten detektierte Serogruppe (16,7%). Die höchsten alters- und wohnregionadjustierten Hospitalisierungsrisiken wurden für die Serogruppen O157 (Referenz) und den Ausbruchsstamm der Serogruppe O104 ermittelt (RR=1,33; 95% Konfidenzintervall [KI] 1,19-1,45). Alle anderen untersuchten non-O157 hatten 46%-73% niedrigere Risiken als O157-Fälle mit RR=0,54 (95% KI 0,41-0,70) für O145 und RR=0,27 (95% KI 0,20-0,35) für O103. Die Sterberisiken (gemäß Meldedaten) waren für O157 und O104 mit jeweils 1,2% Letalität vergleichbar hoch – für die Gruppe aller anderen non-O157-Infektionen aber deutlich niedriger (RR=0,09; 95% KI 0,02-0,33). Diese bevölkerungsbasierten Ergebnisse unterstreichen die besondere Virulenz von STEC der Serogruppe O157. Obwohl die Serogruppeninformation lediglich als Surrogat für die heterogene genomische Virulenzausstattung der STEC dienen kann, eignet sie sich für eine Risikoeinschätzung. Da eine sehr früh eingeleitete Therapie den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann, sollte es eine Anforderung an die Diagnostik sein, STEC O157 in der Primärdiagnostik schnell zu erkennen.

Podiumsdiskussion:

Routinediagnostik von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC)

Die Routinediagnostik beruht derzeit auf dem Nachweis eines Shigatoxins oder eines Shigatoxingens. Eine weitergehende Charakterisierung des Erregers erfolgt im Rahmen der Primärdiagnostik in der Regel nicht. Abgesehen von der im Routinealltag häufig mangelnden Spezifität phänotypischer Nachweisverfahren, erlaubt der ledigliche Befund eines Shigatoxinnachweises, häufig ohne Differenzierung des Toxintyps, keine Abschätzung der Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch die jeweilige STEC-Infektion. Eine rasche Unterscheidung zwischen wenig bis apathogenen und hochvirulenten STEC, die zum hämolytisch-urämischem Syndrom oder gar dem Tod führen können, ist nicht möglich, jedoch von vorrangiger Bedeutung für den behandelnden Arzt und dessen Patient. Zugleich ist die alleinige mikrobiologische Information des Shigatoxinnachweises auch ungenügend, um mögliche Infektionszusammenhänge aufgrund ähnlicher bzw. identischer Erregereigenschaften erkennen zu können. Diese Problematik trat im großen Krankheitsausbruch durch STEC O104:H4 im Frühjahr 2011 besonders deutlich hervor, wo die in primär diagnostizierenden Laboren erhobenen Befunde häufig nicht ausreichten, um eine Entscheidung zu treffen, ob die jeweiligen Patienten individuell dem Krankheitsausbruch zuzuordnen sind. Somit ist die aktuelle Primärdiagnostik von STEC-Infektionen sowohl für die klinische Medizin als auch für den Öffentlichen Gesundheitsdienst (Ausbruchsfrüherkennung auf lokaler Ebene, Zuordnung von Patienten zum Ausbruch) nur bedingt geeignet. Neuere Nachweisverfahren existieren, die eine deutliche Verbesserung gegenüber der bisherigen Diagnostik darstellen. Ihr Einsatz scheitert nicht zuletzt an dem Fehlen einer konkreten Empfehlung für deren Einsatz, aber auch an der momentanen geringen Vergütung der STEC-Diagnostik. Aufgabe: Entwicklung eines Konsensus Papier , Empfehlungen für die Diagnostik

Teilnehmer der Podiumsdiskussion:

PD Dr. D. Werber, RKI Berlin,

Dr. A. Fruth, RKI Wernigerode,

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Karch, Universität Münster,

Prof. Dr. Dr. A. Sing, LGL Oberschleißheim,

PD Dr. F. Stelter, Labor Schottdorf, Augsburg,

Dr. H. Stefanowski, BÄM

B

Abstracts – Nachweisverfahren und Diagnostik

- I. New nomenclature of Shigatoxins and application of a sequence-based protocol for
Its detection
R. Stephan, Zürich
- II. HUS-assoziierte *E. coli* (HUSEC)
H. Karch et al., Münster
- III. Evaluierung phagenprotein-basierter Nachweissysteme zur Diagnostik
von *E. coli* O26, O103, O111, O121, O145 und O157
S. Molinaro et al., Bernried
- IV. Fast microarray-based DNA-serogenotyping of *Escherichia coli*
L. Geue et al., Wusterhausen

I.

New nomenclature of Shigatoxins and application of a sequence-based protocol for its detection

Roger Stephan

Institute for food safety and hygiene, Vetsuisse Faculty, University of Zurich

Shiga toxin (Stx)–producing *Escherichia coli* (STEC) are among the most common causes of foodborne diseases. This organism is responsible for several human gastrointestinal illnesses, including nonbloody or bloody diarrhea. Especially in children, this disease may be affected by neurologic and renal complications, including hemolytic uremic syndrome (HUS). However, STEC can also be found in healthy asymptomatic humans.

STEC strains are characterized by the production of one or more Shiga toxins. Based on cytotoxicity neutralization assays and sequence analysis of Shiga toxin genes, two main Stx groups (Stx1 and Stx2) have been described. According to new nomenclatures, the Stx1 group consists of the Stx1a, Stx1c, and Stx1d subtypes. The Stx2 group is more heterogeneous and includes the Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, and Stx2g subtypes (Anonymous, 2011; Scheutz et al., 2012).

Recently, a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins based on this new nomenclature was established and evaluated (Anonymous, 2011; Scheutz et al. 2012). Its application on two strain collections from patients (Kappeli et al. 2011) and wild ruminants (Hofer et al., 2012), respectively, will be presented. Moreover, an evaluation of different commercially available *stx*-based real-time PCR assays (Margot et al., 2013), done by using strains characterized according to the new Stx nomenclature, will be shown.

References

Anonymous, 2011. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*. Identification of three *vtx1* and seven *vtx2* subtypes of Verocytotoxin encoding genes of *Escherichia coli* by conventional PCR amplification.

<http://www.ssi.dk/English/PublicHealth/National%20Reference%20Laboratories/WHO%20Collaborating%20Centre%20for%20Reference%20and%20Research%20on%20Escherichia%20and%20Klebsiella.aspx>.

Hofer, E., Cernela, N., Stephan, R. 2012. Shiga toxin subtypes associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from red deer, roe deer, chamois and ibex. Foodborne Path. Dis. 9, 792-795.

Käppeli, U., Hächler, H., Giezendanner, N., Beutin, L., Stephan, R. 2011. Human infections with non-O157 Shiga toxin–producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000–2009. Emerg. Infect. Dis. 17, 180-185.

Margot, H., Cernela, N., Iversen, C., Zweifel, C., Stephan, R. 2013. Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of Shiga toxin 1 and 2 gene subtypes. J. Food Prot. 76, 871–873.

Scheutz, F., L. D. Teel, L. Beutin, D. Piérard, G. Buvens, H. Karch, A. Mellmann, A. Caprioli, R. Tozzoli, S. Morabito, N. A. Strockbine, A. R. Melton-Celsa, M. Sanchez, S. Persson, and A. D. O'Brien. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J. Clin. Microbiol. 50:2951–2963.

II.

HUS-assoziierte *E. coli* (HUSEC)

Helge Karch¹, Angelika Fruth², Martina Bielaszewska¹, Wenlan Zhang¹, Barbara Middendorf-Bauchart¹, Andrea Lagemann¹, Robin Köck¹, Andreas Bauwens¹, Ralph Fischer¹, Stefan Bletz¹ und Alexander Mellmann¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, 48149 Münster

² Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, Burgstraße 37, 38843 Wernigerode
e-Mail: Helge.Karch@ukmuenster.de

Keywords: Hämolytisch-Urämisches Syndrom, Virulenz, Shiga Toxin, Evolution, Sequenztypen

Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC), die das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) hervorrufen, werden als HUSEC bezeichnet. Seit 1996 haben wir zusammen mit dem Nationalen Referenzlabor für *Enterobacteriaceae* des RKI in Wernigerode alle von HUS-Patienten isolierten EHEC-Stämme erfasst und sowohl phänotypisch als auch genotypisch charakterisiert. Inzwischen umfasst die HUSEC-Sammlung mehr als 1000 Isolate. Davon dienen 42 Stämme (HUSEC001 – HUSEC042) als repräsentative Referenzen (www.ehec.org). Von den zur Zeit hinterlegten HUSEC-Stämmen wurden der Multilocus Sequenz Typ (MLST) und die *gnd*-Gene, die mit den verschiedenen O-Antigentypen korrelieren, bestimmt. Außerdem haben wir die Profile der wichtigsten Virulenzgene, wie z. B. der *stx*-Allele, erstellt. Die HUSEC-Kollektion ist eine einzigartige Sammlung von Krankheitserregern, die sich als sehr hilfreich für Untersuchungen zum Verlauf evolutiver Veränderungen von STEC erwiesen hat. Von uns erstellte Evolutionsmodelle hypothetisieren, dass sich eine Vielzahl von Ausbruchstämmen erst in neuerer Zeit entwickelt hat [1]. Es kann außerdem davon ausgegangen werden, dass zahlreiche hochpathogene HUSEC von weniger virulenten Vorläufern abstammen. Darüber hinaus stellt die HUSEC-Kollektion eine wertvolle Ressource dar, um zukünftig neben den dominanten Shiga Toxinen weitere, wahrscheinlich kumulativ wirkenden Virulenzfaktoren vom „Nicht-Shiga Toxin-Typ“ zu analysieren. Unsere „Bakterienbibliothek“ wird zukünftig kontinuierlich um weltweit auftretende HUSEC-Stämme erweitert.

[1] Karch H, Muthing J, Dobrindt U, Mellmann A. Evolution und Infektionsbiologie der mit dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) assoziierten *E. coli* (HUSEC). Bundesgesundheitsblatt 2013; 56: 8-14.

III.

Evaluierung phagenprotein-basierter Nachweissysteme zur Diagnostik von *E. coli* O26, O103, O111, O121, O145 und O157

Sonja Molinaro¹ and Karolina Heed²

¹ MicroCoat Biotechnologie GmbH, Am Neuland 3, 82347 Bernried

² Hyglos GmbH, Am Neuland 3, 82347 Bernried

Keywords: Bakteriophagen, Immunomagnetische Separation, Latexagglutination

Seit 2012 verpflichtet die USDA die fleischverarbeitende Industrie zur Routinetestung auf EHEC vom Serotyp O26, O45, O103, O111, O145 und O121. Die Anforderung an die verwendeten Tests sind hohe Sensitivität und Schnelligkeit, um Wartezeiten in den Produktionsabläufen gering zu halten. Die aktuellen Richtlinien (MLG_5B) sehen als ersten Schritt einen real-time-PCR-basierten Nachweis von Shigatoxinen und Serotyp vor. Potentiell positive Proben sollen im weiteren Verlauf mittels „Immuno Magnetic Separation“ (IMS) für den kulturellen Nachweis angereichert und anschließend aus der Einzelkolonie erneut bestätigt werden. Dabei basieren Tests wie IMS oder Latexagglutination auf Antikörpern, welche Strukturen auf der Oberfläche der Zielorganismen erkennen und binden. Trotz guter Sensitivität zeigen viele Antikörper Kreuzreaktionen. Die Herstellung in Tieren ist vergleichsweise kostenintensiv und kann zu Qualitätsschwankungen führen. Im Rahmen der vorgestellten Arbeit wurden magnetische Beads zur Separation von *E. coli* O26, O103, O111, O121, O145 und O157, sowie Latexagglutinationstests zum Nachweis aus Einzelkolonien auf Basis von Wirtserkennungsproteinen aus Bakteriophagen entwickelt und evaluiert. Die Testung der „Affinity Magnetic Separation“ (AMS) erfolgte in Anlehnung an ISO16654 und die aktuellen Richtlinien der USDA. Der kulturelle Nachweis aus 25g künstlich kontaminiertem Rinderhackfleisch wurde nach Anreicherung und Separation auf modifiziertem Rainbow Agar erbracht. Im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Beads konnte eine teilweise erhöhte Bindeeffizienz bei weniger unspezifischer Bindung beobachtet werden. Die Eigenschaften im Latexagglutinationstest wurden für alle Serotypen anhand von Reinkulturen verschiedener Stämme getestet. Die Sensitivität lag bei 100 %, für O121 bei > 90 %. Gegenüber Antikörper-basierten Systemen zeigen die Phagenproteine eine teilweise verbesserte Spezifität und Sensitivität. Die rekombinante Herstellung gewährleistet eine konstante Qualität bei hohen Ausbeuten. Die Stabilität gegenüber Proteasen und thermischen Einflüssen ermöglicht den flexiblen Einsatz der Proteine in der Probenvorbereitung, zum Nachweis und zur Bestätigung lebensmittelpathogener Mikroorganismen.

IV.

Fast Microarray based DNA-Serogenotyping of *Escherichia coli*

Lutz Geue¹, Stefan Monecke^{2,3}, Ines Engelmann², Peter Slickers², Ralf Ehrich²

¹ Friedrich-Loeffler-Institut, Institute of Epidemiology, Seestraße 55, D-16868 Wusterhausen, Germany

² Alere Technologies GmbH, Löbstedter Straße 103 -105, D-07749 Jena, Germany

³ Technical University of Dresden, Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, Fiedlerstraße 42, 01307 Dresden, Germany

Keywords: Oligonucleotid-Microarray, DNA-Serogenotyping, *E. coli*

Serotyping takes a central place in the epidemiology and surveillance of *E. coli* infections, because specific serogroups are associated with certain clinical syndromes [1]. Classical antibody-based serotyping uses specific antibodies for the discrimination of variants of the O antigen, a polymerized side chain bound to the core of the lipopolysaccharide, and the H antigen, which is a flagellar protein, yields important epidemiological information. To cover all known H and O antigens, a large set of costly antisera needs to be stockpiled. Furthermore, conventional serotyping requires substantial amounts of antisera as the tests are usually performed as simple agglutination assays, and they need to be performed by trained and experienced staff. Therefore, conventional serotyping is largely restricted to specialized laboratories. Moreover, agglutination results are not always beyond doubt as the quality of batches of sera may vary and cross-reactions can occur. A minority of strains cannot be typed for various reasons such as the masking of capsular antigen. Furthermore, there are non-motile strains that do not express the flagellar antigen, for which only information on the O antigen can thus be obtained. As a consequence, classical antibody-based serotyping is not suitable for use in routine diagnostics.

Balmer et al. [2] developed a diagnostic oligonucleotide-based DNA microarray for the detection of 24 of the epidemiologically most relevant of the over 180 known O antigens and for 47 of the 53 different H antigens. In this study, we present a significant progress in the development of this oligonucleotide-based DNA microarray. The microarray has been expanded to cover 94 O antigen groups. Moreover, the microarray was transferred into the ArrayStrip format by Alere Technologies GmbH (Jena, Germany), which allows to conduct high through-put tests in 96 well formats and fully automated microarray analysis during imaging.

The microarray was verified with a set of reference strains that had previously been serotyped by conventional agglutination through various reference centers. For the validation of the microarray, 210 clinical *E. coli* isolates of human origin (isolates from urine samples, blood cultures, bronchial secretions and wound swabs) and 53 *E. coli* isolates of animal origin (isolates from cattle, pigs and poultry) were used.

This oligonucleotide array represents a diagnostic tool that is easier and more efficient than the classical serotyping by agglutination. It facilitates epidemiological studies on *E. coli* infections. Furthermore, such tests can be performed in nearly every lab, easily expanded and standardized.

[1] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2:123-140.

[2] Ballmer K, Korczak BM, Kuhnert P, Slickers P, Ehrich R, Hachler H. Fast DNA serotyping of *Escherichia coli* by use of an oligonucleotide microarray. J Clin Microbiol 2007; 45:370-379



Abstracts – EHEC und Lebensmittel

- I. Die Task Force EHEC als Beispiel eines zentralen Instruments im bundesweiten Krisenmanagement
B. Müller et al., Oberschleißheim
- II. Molekularbiologische Untersuchung des Subtilase Zytotoxins von STEC
J. Funk et al., Hohenheim
- III. Untersuchungen zur Tenazität von *E. coli* O104:H4
C. Böhnlein et al., Kulmbach

I.

Die Task Force EHEC als Beispiel eines zentralen Instruments im bundesweiten Krisenmanagement

Britta Müller, Michael Bucher, Albert Rampp

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

e-Mail: britta.mueller@lgl.bayern.de

Keywords: Task Force, Krisenmanagement, Rückverfolgbarkeit, Ausbruchs Cluster

Ob EHEC, Fukushima oder die Finanznot in Zypern - zahlreich wie heterogen sind die Ereignisse, die zu Krisen führen können. Je bedrohlicher die Krise ist oder öffentlich wahrgenommen wird, desto wirkungsvoller müssen die eingesetzten Instrumente des Krisenmanagements sein.

Bei dem bislang größten EHEC-Ausbruch in Deutschland mit über 3200 EHEC-Infektionen, 845 HUS-Erkrankten und 48 an den Folgen der Erkrankung Verstorbenen wurde als Instrument des Krisenmanagements die Task Force (TF) EHEC ins Leben gerufen [1]. Die TF EHEC wurde durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) im Mai 2011 etabliert. Erstmals in dieser Form, bestand sie aus Experten mehrerer Bundesländer, dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Unterstützend wirkten auch Experten des Robert Koch-Institutes (RKI) mit. Mitarbeiter des BVL und des Bayerischen Landesamtes für Lebensmittelsicherheit haben die Arbeit der TF gelenkt und koordiniert [2].

Um die Zusammenarbeit innerhalb der Gruppe möglichst effektiv gestalten zu können, musste die Herkunft aus unterschiedlichen Behörden mit unterschiedlichen Ansätzen und Zielsetzungen beachtet werden. Gleichzeitig stellte diese Heterogenität der Gruppe auch eine einmalige Chance dar. Aus diesem Grund waren klare Rahmenbedingungen und strukturelle Vorgaben zwingend erforderlich. Dazu gehörte u. a. eine konkrete Zieldefinition mit einer entsprechenden Unterteilung in Teilziele und sich daraus ergebender präziser Aufgabenverteilung.

Ziel dieser operativen Einheit war es, die mit dem EHEC O104:H4-Ausbruch assoziierten Lebensmittel zu identifizieren und das Ausbruchsgeschehen zu stoppen.

Mit den Werkzeugen der epidemiologischen Ausbruchsuntersuchung, insbesondere der Auswertung von repräsentativen Ausbruchsorten („Clustern“) und der Rückverfolgung der Lebensmittel entlang der Lieferketten, gelang es der TF, Bockshornklee aus Ägypten mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Ausbruch zuzuordnen [2].

Dieser Beitrag soll die Aufgaben und Ergebnisse der TF EHEC im Krisengeschehen im Mai/Juni 2011 skizzieren, ein Konzept für eine künftige TF vorstellen und die Bedeutung der Rückverfolgbarkeit von Lebensmitteln als Instrument des Risikomanagements darstellen.

[1] EHEC-Ausbruch 2011, Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette, BfR, 04/2011

[2] Ergebnisbericht der Task Force EHEC zur Aufklärung des EHEC O104:H4 Krankheitsausbruchs in Deutschland, Stand 02.08.2011

II.

MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES SUBTILASE ZYTOTOXINS VON STEC

Joschua Funk; Helen Stoeber; Elisabeth Hauser; Herbert Schmidt

*Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Universität
Hohenheim, Garbenstraße 28, 70599 Stuttgart,
e-Mail: joschua.funk@uni-hohenheim.de*

Keywords: Lebensmittel, STEC, Subtilase Zytotoxin, SubAB-Variante

Die Produktion von Shiga Toxinen sowie der Genprodukte des „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) gelten als hauptverantwortlich für schwere Verlaufsformen bei einer Infektion mit Shiga-Toxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC). Häufig scheinen jedoch auch andere Genprodukte einen Einfluss auf den Verlauf einer Infektion zu nehmen. So führte das im Jahr 2004 erstmals beschriebene Subtilase Zytotoxin (SubAB) im Mausmodell zu einer dem hämolytisch-urämischen-Syndrom (HUS) vergleichbaren Symptomatik [1]. Das häufige Vorkommen des *subAB*-Gens bei STEC-Stämmen macht die Notwendigkeit genauer Untersuchungen deutlich [2].

Im Rahmen dieser Studie wurden PCR Analysen von achtzehn Lebensmittel-assoziierten *subAB*-positiven Stämmen durchgeführt [3]. Für neun der achtzehn Stämme aus unterschiedlichen Lebensmitteln konnte eine Assoziation mit dem von Paton et al. [1] beschriebenen *subAB*₁-Operon bestätigt werden. Die genetische Lokalisation des Operons wurde durch Southernblot-Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde ermittelt. Hierbei konnten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen gezeigt werden, die auf eine isolatspezifische Variabilität von *subAB* hinweisen. Es konnte gezeigt werden, dass alle aus Rehfleisch isolierten Stämme eine chromosomale Kodierung aufweisen, wohingegen für die übrigen Stämme eine Lokalisation auf großen Plasmiden bestätigt werden konnte. Weitere PCR- und Sequenz-Analysen der *subAB*-Operons bestätigten die Präsenz zweier unterschiedlicher Toxin-Subtypen (*subAB*₁ und *subAB*₂ [2]), die neben der unterschiedlichen genetischen Lokalisation auch Unterschiede in der direkten Genumgebung aufweisen. Weitere Vergleiche der verschiedenen Sequenzen verdeutlichen die hohe Konservierung der Plasmid-kodierten Variante *subAB*₁, während *subAB*₂-positive Stämme abhängig von der Lokalisation des Operons Unterschiede aufweisen. Die Toxizität der Genprodukte des *subAB*-Operons wurde exemplarisch durch rekombinante Expression und Aufreinigung der Toxin-Untereinheiten sowie deren Einsatz innerhalb eines Zellkultur-Assays überprüft und die toxische Aktivität bestätigt. Auf Basis der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Lebensmittel-assoziierten Stämme einen intakten offenen Leserahmen aufweisen. Darüber hinaus lassen sich die gefundenen Varianten spezifischen Lebensmitteln zuweisen, mit bisher unbekanntem Auswirkungen auf das pathogene Potential der Stämme.

[1] Paton A, Srimanote WP, Talbot UM, Wang H, and Paton JC. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *E. coli*. 2004; J Exp Med. 200: 35-46. doi:10.1084/jem.20040392 [doi];jem.20040392 [pii].

[2] Michelacci V, Tozzoli R, Caprioli A, Martínez R, Scheutz F, Grande L, Sánchez S, Morabito S. A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:E149-56. doi:10.1111/1469-0691.12122. Epub 2013 Jan 17. PubMed PMID: 23331629.

[3] Slanec T, Fruth A, Creuzburg K, and Schmidt H. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 2009. 75:6187-6197. doi:AEM.00874-09 [pii];10.1128/AEM.00874-09 [doi].

III.

Untersuchungen zur Tenazität von *E. coli* O104:H4

Christina Böhnlein, Jan Kabisch und Rohtraud Pichner

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner Institut, Dienststellen: Kulmbach und Kiel

Keywords: EHEC/STEC, Rohwurst, survival, food

Im Frühsommer 2011 wurde in Deutschland der bisher größte Ausbruch mit enterohämorrhagischem *Escherichia coli* (EHEC) verzeichnet. EHEC sind lebensmittel-assoziierte Zoonoseerreger und stellen eine Untergruppe der Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC) dar, die beim Menschen schwere bis tödlich verlaufende Erkrankungen, wie Durchfall, hämorrhagische Colitis (HC) und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen können. *E. coli* Stämme der Serogruppen O157, O26, O103, O111 und O145 sind die bislang am häufigsten isolierten EHEC bei Menschen mit HC und HUS. Als Erreger des Ausbruchs im Jahr 2011 wurde ein sehr seltener *E. coli* Serotyp O104:H4 mit einem ausgeprägtem pathogenen Potenzial identifiziert. Gemessen an der Zahl der gemeldeten HUS-Fälle (> 800) handelte es sich dabei um den größten Ausbruch weltweit. Sequenzanalysen zeigten, dass der Ausbruchstamm sowohl DNA-Abschnitte mit einer über 90% igen Übereinstimmung von enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) als auch das stx2-Gen von EHEC besitzt.

Um Aussagen zur Tenazität dieses neuartigen Hybrid-Stamms im Vergleich zum bereits bekannten *E. coli* Serotyp O157 treffen zu können, wurde in Challengeversuchen das Verhalten von drei ausbruchs-assoziierten STEC-Isolaten (*E. coli* O104:H4, *E. coli* O157:H⁻, *E. coli* O157:H7 ATCC43895) bei der Fermentation, Reifung und Lagerung von schnittfester Rohwurst (Salami) untersucht. Dabei wurde unter definierten Bedingungen das Brät der Modell-Salami mit ca. log 3 KBE/g des jeweiligen STEC-Stamms artifiziiell kontaminiert, und das Wachstum des Erregers auf Sorbit-MacConkey-Agar (SMAC) über einen Zeitraum von 60 Tagen überprüft. Während der Fermentation innerhalb der ersten drei Tage wurde eine Reduktion der STEC-Keimzahlen um ca. 1 log (für *E. coli* O157) bzw. 0.7 log (für *E. coli* O104:H4) nachgewiesen. In der Reifungsphase bis zum Tag 14 reduzierten sich die STEC-Keimzahlen um weitere 0.6 log (für *E. coli* O157) bzw. 0.7 log (für *E. coli* O104:H4). Während der Lagerung war ein STEC-Nachweis nach selektiver Anreicherung bis zum Ende der Mindesthaltbarkeitsdauer (Tag 60) möglich. Dabei waren *E. coli* O157:H⁻ und *E. coli* O104:H4 in 10 von 12 bzw. 6 von 18 Anreicherungen nachweisbar, während *E. coli* O157:H7 nicht mehr detektiert wurde. Die Studien zeigen, dass die Tenazität von *E. coli* O104:H4 in Rohwurst mit dem Verhalten von *E. coli* O157 vergleichbar ist.

D

Abstracts – EHEC in Tier und Umwelt

- I. Einfluss krafftutterreicher Fütterung beim Rind auf die Ausscheidung von *E. coli*, insbesondere von STEC
L. Geue et al., Wusterhausen
- II. Vergleichende Studien an Verotoxin- bildenden *Escherichia coli* (VTEC) der Serogruppen O27, O91 und O113 aus Human-, Tier- und Lebensmittelproben
S. Schlager et al., Graz

I.

Einfluss kraftfutterreicher Fütterung beim Rind auf die Ausscheidung von *E. coli*, insbesondere von STEC

Lutz Geue¹, Birgit Mintel¹, Franz J. Conraths¹, Ulrich Meyer², Sven Dänicke²

¹ Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie, Seestraße 55, D-16868 Wusterhausen, Germany

² Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Tierernährung, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany

Keywords: *E. coli*-Ausscheidung, STEC-Ausscheidung, Rinder, kraftfutterreiche Fütterung

Obwohl im Zusammenhang mit dem EHEC O104:H4-Ausbruch 2011 ein tierisches Reservoir für den Ausbruchsstamm schnell ausgeschlossen werden konnte, wurde in den Diskussionen in den Medien die kraftfutterreiche Fütterung von Wiederkäuern als eine mögliche Ursache für erhöhte Ausscheidung von STEC durch diese Tiere ins Gespräch gebracht. Diese These ging auf eine Studie zurück, die 1998 von amerikanischen Autoren publiziert wurde [1]. Spätere Studien führten dagegen zu widersprüchlichen Einschätzungen. Ziel unserer Untersuchungen war es deshalb, den Einfluss der Fütterung von Rindern auf die Quantität der fäkalen Ausscheidung von *E. coli* insgesamt und von STEC im Besonderen zu untersuchen. Über die Erfassung der tierindividuellen Futteraufnahme wurden die Zusammenhänge zwischen *E. coli*-Ausscheidung, Kraftfutteranteil und Höhe der Futteraufnahme verifiziert.

Zwei Gruppen von jeweils 24 Mastbullen wurden in die Studie einbezogen. Die Fütterung der ersten Gruppe erfolgte mit Grassilage als Grundfutter und einem zusätzlichen Anteil von 7% Kraftfutter („kraftfutterarm“). Die zweite Gruppe wurde mit dem gleichen Grundfutter aber einem Kraftfutteranteil von 50% gefüttert („kraftfutterreich“). Nach Abschluss der Mastperiode wurden jeweils 12 Bullen jeder Gruppe geschlachtet, bei den verbleibenden 12 Bullen jeder Gruppe wurde eine Futterumstellung durchgeführt, so dass die ursprünglich „kraftfutterarm“ gefütterte Gruppe nun „kraftfutterreich“, die ursprünglich „kraftfutterreich“ gefütterte Gruppe „kraftfutterarm“ gefüttert wurden. Für die Untersuchungen wurden Kotproben zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Futterumstellung entnommen. Zusätzlich wurden bei allen Tieren die tägliche tierindividuelle Futter- und Wasseraufnahme, die wöchentliche Lebendmasse sowie klinisch-chemische Parameter im Blut erfasst.

Die Ergebnisse zeigten, dass vor der Futterumstellung die Gesamtzahl von *E. coli* in der „kraftfutterreich“ gefütterten Gruppe signifikant höher war als in der „kraftfutterarm“ gefütterter Gruppe. Mit der Futterumstellung kehrte sich auch die Quantität der *E. coli*-Ausscheidung um, die ursprünglich „kraftfutterarm“ und jetzt „kraftfutterreich“ gefütterte Gruppe schied nun im Mittel signifikant mehr *E. coli* aus als die andere Gruppe. STEC wurden in beiden Gruppen sowohl vor als auch nach der Futterumstellung nachgewiesen, einen Einfluss auf die Quantität der STEC-Ausscheidung schien die Fütterung nicht zu haben.

[1] Diez-Gonzalez F, Callaway TR, Kizoulis MG, Russell JB. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. Science 1998; 281:1666-1668.

II.

Vergleichende Studien an Verotoxin bildenden *Escherichia coli* (VTEC) der Serogruppen O27, O91 und O113 aus Human-, Tier- und Lebensmittelproben

Mara Haubenwallner¹, Oksana Ableitner², Sabine Schlager²

¹ Fachhochschule Joanneum Graz, Biomedizinische Analytik, Eggenberger Allee 13, A-8020 Graz

² Nationale(s) Referenzzentrale/Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*, Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), Institut für Medizinische Mikrobiologie, Zentrum für lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten, Beethovenstraße 6, A-8010 Graz

Keywords: VTEC, Shigatoxin-Subtypen, Virulenzfaktoren, Tier, Lebensmittel

Einleitung: Bei Untersuchungen an Proben von Wildfleisch und Wildfleischprodukten am Nationalen Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli* fielen vermehrt die VTEC-Serogruppen O27, O91 und O113 auf. Auch beim jährlich durchgeführten Zoonosemonitoring, bei dem die VTEC-Kolonisierung des österreichischen Rinder- und Schafbestands überwacht wird, kamen diese drei VTEC-Serotypen vor. Ziel dieser Arbeit war es Virulenzmerkmale und Shigatoxin-Subtypen dieser drei VTEC-Serogruppen isoliert aus Rindern, Schafen und Wildfleisch (und deren Produkten) mit entsprechenden Humanisolaten in Korrelation zu bringen.

Material und Methoden: Folgende in den Jahren 2010-2012 in die/das Nationale(s) Referenzzentrale/Referenzlabor eingesandte Proben wurden untersucht: siebzehn VTEC O27 (Mensch (7), Schaf (1), Wild (8), Wasser (1)), 27 VTEC O91 (Mensch (6), Rind (13), Schaf (6), Wild (2)) und 36 VTEC O113 (Mensch (14), Rind (9), Schaf (10), Ziege (1), Wild (2)). Über 60 Virulenzgene wurden mit Oligonucleotid Mikroarrays (EC ArrayTube™, Identibac) analysiert [1]. Die Shigatoxin-Subtypen wurden mittels PCR ermittelt [2].

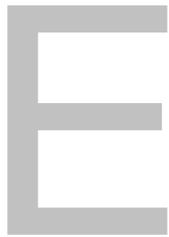
Ergebnisse und Diskussion: Im Österreichischen Zoonosemonitoring wurde in den oben erwähnten drei Jahren von insgesamt 442 Isolaten nur einmal VTEC O27 aus Schaf, nie aus Rind, nachgewiesen. Acht der insgesamt 142 untersuchten Lebensmittelisolate waren VTEC O27 aus Wildfleisch bzw. Wildfleischprodukten. Alle Human- und Wildfleischisolate waren: *iha+*, *mch+* und *stx2b+*. Hier ist die Korrelation zwischen Wild- und Humanisolaten deutlich erkennbar.

Humane VTEC O91, zeigten aufgrund der Verteilung der Shigatoxin-Subtypen eine Assoziation zu entsprechenden Isolaten aus Rindern (*stx2a,d+*) und Schafen (*stx1a+* und *stx1a,2b+*), nicht jedoch zu solchen aus Wildfleisch und Wildfleischprodukten (*stx2b+* und *stx1a2d*).

Die Shigatoxin-Subtypen der VTEC O113 aller untersuchten Tierarten kommen auch in Humanisolaten vor: Schaf: *stx2b* und *stx1c,2b*, Rind: *stx2a* und *stx2d*, Wild: *stx1a,c,2b* und Ziege: *stx1c,2b*.

[1] Anjum MF, et al.: *Pathotyping Escherichia coli by using miniaturized DNA Microarrays*. Applied and Environmental Microbiology 2007; 17: 5692-5697

[2] Scheutz F, et al.: *Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing stx nomenclature*. Journal of Clinical Microbiology 2012; 50: 2951-2963



Abstracts – Pathogene *E.coli*

- I. Transduktion des atypischen enteropathogenen *E. coli* (aEPEC) IMT19981 (O26:H-, ST21) mit einem Shiga Toxin-konvertierenden Bakteriophagen – Die Rolle von aEPEC als Pre-EHEC
I. Eichhorn et al., Berlin
- II. Genotypisierung enteroaggregativer *Escherichia coli* (EAEC)
C. Dracopoulos et al., Lübeck
- III. Auswirkungen einer antibiotischen Therapie auf die Pathogenität von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* O104:H4 in vitro
U. Lindner et al., Lübeck

I.

Transduktion des atypischen enteropathogenen *E. coli* (aEPEC) IMT19981 (O26:H-, ST21) mit einem Shiga Toxin-konvertierenden Bakteriophagen – Die Rolle von aEPEC als Pre-EHEC

Inga Eichhorn¹, Astrid Bethé¹, Bianca Kinnemann¹, Herbert Schmidt², Helge Karch³, Derek Pickard⁴, Gordon Dougan⁴, Torsten Semmler¹, Lothar H. Wieler¹

¹Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland ²Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Universität Hohenheim, Hohenheim, Deutschland ³Institute für Hygiene, Universität Münster, Münster, Deutschland ⁴Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, United Kingdom

Keywords: Shiga Toxin-konvertierende Bakteriophagen, EHEC, aEPEC, Transduktion, Integrationsstelle

Die Gene für Shiga-Toxin 1 (*stx*₁) und Shiga-Toxin 2 (*stx*₂) sind auf lambdoiden Bakteriophagen kodiert, welche als Prophagen in das Genom von enterohämorrhagischen *E. coli* integriert sind und die charakteristische Toxin-Bildung vermitteln. Durch den Einfluss von Umweltstress, wie z.B. Antibiotika, erfolgt in der Bakterienzelle eine SOS-Antwort, in deren Verlauf u.a. der Q-Antiterminator des Bakteriophagen aktiviert wird. Als Folge geht der Phage vom lysogenen Zyklus in den lytischen Zyklus über. Die in dieser Phase gebildeten Phagenpartikel können wiederum andere Bakterien infizieren, wie zum Beispiel atypische enteropathogene *E. coli*, die sich von den typischen EHEC nur durch die Abwesenheit des *stx*-Gens unterscheiden. Eine natürliche Transduktion von aEPEC mit *stx*-Bakteriophagen konnte im Darm von Tieren [1, 2] bereits nachgewiesen werden. Daraus resultierte die Hypothese, dass die Integration von *stx*-konvertierenden Phagen in das Genom von aEPEC dazu führt, dass diese in typische EHEC transformiert werden können und aEPEC Vorläufer von typischen EHEC sind.

Um diese Hypothese *in vitro* zu beweisen, wurde ein modifizierter Plaqueassay eingesetzt, bei dem ein hoher Phagentiter die Wahrscheinlichkeit von auftretenden Transduktionsereignissen erhöht. Der bovine aEPEC-Stamm IMT19981 des Sequenztypkomplexes STC29 konnte mit einem Shiga-Toxin deletierten Phagen (Φ 3538 Δ *stx*₂::*cat* [3]) transduziert werden. Die Integration des Phagen in das Genom von IMT19981 konnte sowohl durch Amplifikation des Gens *cat* als auch durch Southern Blot mit einer markierten *cat*-DNA-Sonde, nach Restriktion mit *Xba*I und Pulsfeldgelelektrophorese, nachgewiesen werden. Durch Ganz-Genomsequenzierung konnte gezeigt werden, dass in der bekannten Integrationsstelle *argW* in IMT19981 ein Prophage lokalisiert ist, der großer Ähnlichkeit zum Phagen ECO26 P18 aus *E. coli* O26:H11 Stamm 11368 (NC_013361) aufweist. Die Analyse der Genomsequenzen von zwei Transduktanten (IMT19981 Φ 3538 Δ *stx*₂::*cat* T1, IMT19981 Φ 3538 Δ *stx*₂::*cat* T3) zeigte, dass der Phage Φ 3538 Δ *stx*₂::*cat* zusätzlich zu dem schon vorhandenen Prophagen in diese Integrationsstelle inseriert wurde. *argW* ist in den transduzierten Stämmen somit durch zwei Prophagen besetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Transduktion von aEPEC mit *stx*-konvertierenden Bakteriophagen *in vitro* möglich ist. Weiterhin wurde durch die vergleichende Analyse der Genomsequenzen von aEPEC und transduziertem Stamm gezeigt, dass eine Integrationsstelle von zwei unterschiedlichen Bakteriophagen als Target zur Integration in das Genom von Bakterien genutzt werden kann.

1. Besser, T.E., et al., Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(3): p. 671-9.
2. Shaikh, N. and P.I. Tarr., J Bacteriol, 2003. **185**(12): p. 3596-605.
3. Schmidt, H., M. Bielaszewska, and H. Karch, Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(9): p. 3855-61.

II.

Genotypisierung enteroaggregativer *Escherichia coli* (EAEC)

Christoph Dracopoulos¹, Susanne Hauswaldt¹, Sabrina Tofern¹, Matthias Kalitzky²,
Werner Solbach¹, Johannes Knobloch¹

¹ Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

² Partnerschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie Ärztliche Praxisgemeinschaft Hameln aecoLab
GmbH

Keywords: EAEC, *aggR*, Biofilm, MLST, Rep-PCR

Einleitung: Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) sind darmpathogene Erreger, die als Ursache sowohl für akute als auch für persistierende Diarrhoe bei Kindern und erwachsenen Patienten in Frage kommen. Für die das pAA Plasmid tragende EAEC ist eine Vielzahl unterschiedlicher Genotypen beschrieben. Für Deutschland bestehen bisher keine Daten zu den prävalenten EAEC Genotypen. Deshalb wurden in dieser Studie in Deutschland isolierte EAEC genotypisiert.

Methoden: Stuhlproben von Patienten aus dem Großraum Hannover wurden mittels PCR auf das Vorliegen des pAA Plasmids gescreent (*aggR*-PCR). Aus PCR-positiven Stuhlproben wurde von bis zu 16 Kolonien ein *in vitro* Biofilmtest durchgeführt. Biofilm-positive Isolate wurden erneut mittels PCR auf das *aggR*-Gen überprüft. Alle bestätigten EAEC wurden mittels *multilocus sequence typing* (MLST) genotypisiert und die Präsenz der Gene *pic* und *astA* mittels PCR überprüft. EAEC Isolate mit dem Sequenztyp ST10 und ST200 wurden mit Vergleichsisolaten dieser Sequenztypen aus einer EAEC Stammsammlung aus Sachsen-Anhalt (Hauswaldt, unpublizierte Daten) mittels Rep-PCR verglichen.

Ergebnisse: Es konnten 29 typische EAEC-Stämme von unterschiedlichen Patienten typisiert werden. Der potentielle chromosomal kodierte Virulenzfaktor *pic* konnte in 24/29 Stämmen nachgewiesen werden, während das Gen *astA* nur in 15/29 detektierbar war. Die Genotypisierung der Stämme ergab eine Prädominanz der MLST Sequenztypen ST10 und ST200. Diese Sequenztypen wurden in einer großen internationalen Studie von EAEC Isolaten (Okeke, PLoS one, 2010) sowie in einer Stammsammlung aus Sachsen-Anhalt ebenfalls häufig nachgewiesen. Die Rep-PCR der Sequenztypen ST10 und ST200 ergab eine hohe Diversität innerhalb des ST10, während innerhalb des ST200 auch bei Isolaten aus unterschiedlichen Jahren und Regionen eine hohe Homologie zu finden ist.

Zusammenfassung: Auch in Deutschland können EAEC regelhaft als darmpathogene *E. coli* nachgewiesen werden. Die Sequenztypen ST10 und ST200 sind die am häufigsten nachgewiesenen Genotypen in der Studie. Innerhalb des ST10 lässt sich jedoch auf Grund der unterschiedlichen Ausstattung mit Virulenzfaktoren und der Rep-PCR eine hohe Diversität nachweisen.

III.

Auswirkungen einer antibiotischen Therapie auf die Pathogenität von Shiga-Toxin produzierenden *Escherichia coli* O104:H4 in vitro

Ulrich Lindner^{1,2}, Susanne Hauswaldt¹, Hendrik Lehner², Martin Nitschke² und Johannes Knobloch¹

¹ Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck.

² Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

e-Mail: Ulrich.Lindner@uk-sh.de

Einleitung: Die antibiotische Therapie einer akuten Infektion mit Shiga-Toxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC/EHEC) galt vor dem Ausbruch in Norddeutschland 2011 mit STEC O104:H4 als kontraindiziert. In neueren Studien konnten jedoch asymptomatische Langzeitträger von O104:H4 durch Gabe von Azithromycin erfolgreich dekolonisiert werden. Diese Daten sprechen für einen möglichen Paradigmenwechsel in der Behandlung von STEC-Infektion durch Antibiotika. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung von Azithromycin auf die Adhärenz von STEC O104:H4 und anderen STEC anhand eines Zellkulturmodells untersucht.

Methoden: O104:H4 und andere STEC wurden zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen von Azithromycin (4µg/mL-0,5µg/mL in einem Nährmedium) für 24 h vorbehandelt. Nach 24h wurden die Suspensionen auf Hep2-Zellen aufgebracht und für 3h kultiviert, um Veränderungen im Adhärenzverhalten zu testen. Zeitgleich wurden antibiotisch nicht vorbehandelte STEC erst im Zellnährmedium mit Azithromycin in Kontakt gebracht, um die Kurzzeitwirkung von Azithromycin auf die Zelladhärenz von STEC zu untersuchen.

Ergebnisse: Sowohl in den Modellen mit Langzeitantibiotikakontakt als auch den Kurzzeitmodellen war die charakteristische „brick-stone“ Formation der enteroaggregativen STEC Stämme aufgehoben. In den Langzeitmodellen war zudem die Gesamtzahl der STEC signifikant ($p < 0,01$) vermindert -selbst unter der nicht inhibitorischen Azithromycin-Konzentration von 0,5 µg/mL. In den Kurzzeitmodellen war lediglich die Adhärenz der STEC an Zellen als auch untereinander zugunsten vereinzelter, vitaler STEC verändert. In ‚Colony-Forming-Units‘ – Experimenten zeigte sich jedoch eine vergleichbare Gesamtzahl von STEC. Vergleichbare Experimente mit Ciprofloxacin (10µg/mL-0,2µg/mL) führten zu keinen Veränderungen im Adhärenzverhalten von STEC, jedoch zu einer verminderten Anzahl vitaler STEC.

Schlußfolgerung: Azithromycin vermindert die Adhärenz von O104:H4 ohne offensichtliche, ausgeprägte bakterizide Effekte in vitro. Diese Eigenschaften qualifizieren Azithromycin als potentielle Option zur Therapie einer akuten Infektion mit STEC - mit dem Ziel der Vermeidung eines HUS.

Workshop: Umsetzung Infektionsschutzgesetz: Umgang mit Personen, die STEC über eine längere Zeit ausscheiden.

Eine wesentliche Aufgabe für den Öffentlichen Gesundheitsdienst ist die Verhinderung der Infektionsweiterverbreitung. Dabei stellt der Umgang mit STEC-ausscheidenden Personen eine besondere Herausforderung dar, insbesondere wenn diese berufliche Tätigkeiten in Gemeinschaftseinrichtungen ausüben bzw. dort betreut werden, oder beruflich Umgang mit bestimmten Lebensmitteln haben, bei denen sie mit diesen in Berührung kommen. Hierfür sieht das Infektionsschutzgesetz prinzipiell Verbote für die Wiederezulassung zu Gemeinschaftseinrichtungen bzw. für die Ausübung der beruflichen Tätigkeit vor. Von diesen Verboten kann die zuständige Behörde (in der Regel das Gesundheitsamt) jedoch Ausnahmen erlassen, wenn Maßnahmen durchgeführt werden, mit denen eine Übertragung der aufgeführten Erkrankungen und Krankheitserreger verhütet werden kann. Diese Ausnahmen spielen immer dann eine besondere Rolle, wenn Personen die Erreger über einen längeren Zeitraum ausscheiden. Hier können über einen längeren Zeitraum geltende Wiederezulassungsverbote drastischen sozialen Konsequenzen für die Betroffenen und ggf. deren Erziehungsberechtigte mit sich bringen. Da keine Maßnahme eine Infektionsübertragung mit letzter Sicherheit verhindern kann, ist hier eine Risikoabwägung notwendig, bei der das Virulenzprofil des Erregers eine mitentscheidende Rolle spielt. Tendenziell ist bei wenig virulenten STEC eine Ausnahme vom Verbot leichter begründbar als bei hochvirulenten STEC. Dementsprechend findet sich im RKI-Ratgeber für Ärzte auch die allgemeine Empfehlung „Bei Langzeitausscheidern sollte das Virulenzprofil des EHEC-Stammes (einschließlich Serotyp, Toxintyp und Vorhandensein des *eae*-Gens) in die Risikoabwägung einbezogen werden“. In der Praxis fehlen bislang jedoch in Deutschland konkretere Empfehlungen oder Kriterien für die Entscheidung, wann eine Ausnahme vom Verbot verantwortet werden kann.

Teilnehmer des Workshops:

Dr. W. Hautmann, LGL Oberschleißheim;

PD Dr. D. Werber, RKI Berlin;

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Karch, Universität Münster;

Dr. M. Pulz, LGA Hannover;

Prof. Dr. G. Peters, Universität Münster;

Vertreter von Gesundheitsämtern

F

Abstracts – Pathogenitätsfaktoren und Genomics

- I. Inhibition der Schutzfunktion des Komplementsystems durch Interferenz von Shigatoxin mit löslichen Komplementfaktoren
R. Würzner et al., Innsbruck
- II. Inhibition der Schutzfunktion des Komplementsystems durch Shigatoxin-induzierte Herabregulation membranständiger Komplementregulatoren
D. Orth-Höller et al., Innsbruck
- III. Status quo der Shigatoxin-Rezeptorforschung: humane mikrovaskuläre Endothelzellen im Fokus
J. Müthing et al., Münster
- IV. Die Expression spezifischer Glykosyltransferasen und der Gehalt an Shiga Toxin-bindenden Glykosphingolipiden bestimmen die Toxinsensitivität von humanen lymphoiden und myeloiden Zellen
I. Kouzel et al., Münster
- V. Expression des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG in Shiga Toxin produzierenden *Escherichia coli*-Stämmen
T. Kuczius et al., Münster
- VI. SNP-Typisierung und Krankheitsassoziation von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O26:H11/H-
S. Bletz et al., Münster

I.

Inhibition der Schutzfunktion des Komplementsystems durch Interferenz von Shigatoxin mit löslichen Komplementfaktoren

R. Würzner¹, K. Polpool¹, P.F. Zipfel², C. Skerka², S. Rodríguez De Córdoba³,
D. Karpman⁴, D. Orth¹

¹ *Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria,*

² *Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research Biology, Jena, Germany,*

³ *Department of Immunology, Center of Biological Investigations, Madrid, Spain,*

⁴ *Department of Pediatrics, University of Lund, Lund, Sweden.*

Background: There are limited data on the pathogenesis of HUS. However, a role of complement in HUS has been reported recently: Stx2 activates the alternative pathway of complement and binds to regulatory protein factor H (FH). This in the fluid phase unrestricted complement activation can enhance the destruction of the kidney. Complement factor H-related protein 1 (FHR1) and factor H-like protein 1 (FHL-1) are proteins of the FH protein family that show a structure and sequence relationship to FH. Furthermore they also act as regulators of the alternative pathway. Here, we determine whether Stx2 also binds to complement regulatory proteins FHR1 and FHL-1 and characterize the impact of that binding.

Methods: By use of ELISA, Stx2 was immobilized onto microtiter plates. After blocking, FH or FHR1 or FHL-1 were applied and anti-FH was used for detection. Cofactor activity assay of FHL-1 bound to Stx2 was determined by measuring the factor I-mediated degradation of C3b and was analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

Results: Stx2 binds to FH (as previously published) but also bound to FHR1 and FHL-1. FHR1 dose-dependently competed with FH for Stx2 binding. The FHR1 binding site for Stx2 was located to the C-terminal short consensus repeats (SCRs) 3-5, resembling SCRs 18-20 of FH, the previously determined C-terminal binding site of Stx2 on FH. The FHL-1 binding site for Stx2 was not located, but presumably resides in SCRs 6-7 of FHL-1, where the N-terminal binding site of Stx2 has previously been determined for FH. Both allotypes of FHR1 (FHR1*A and FHR1*B) bind to Stx2. FHL-1 retained its function (cofactor activity) for factor I-mediated C3b inactivation when bound to Stx2. Investigation of the subunits of Stx showed that Stx beta subunit binds to FH and FHR1, whereas FHL-1 was not tested here.

Conclusion: In summary, Stx2 binds to FH, FHR1, and FHL1, indicating multiple interactions of Stx with the complement system which may affect the regulatory function of FH and likely contributes to complement activation and kidney destruction in EHEC-associated HUS. However, it is difficult to evaluate the net effect of these different binding competitions.

II.

Inhibition der Schutzfunktion des Komplementsystems durch Shigatoxin-induzierte Herabregulation membranständiger Komplementregulatoren

D. Orth-Höller¹, S. Ehrlenbach¹, A. Rosales¹, W. Posch¹, D. Wilflingseder¹, M. Hermann², J. Brockmeyer³, H. Karch⁴, S. C. Satchell⁵, R. Würzner¹

¹Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

²KMT Laboratory, Department of Visceral, Transplant and Thoracic Surgery, Center of Operative Medicine, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

³Institute of Food Chemistry, University of Münster, Münster, Germany

⁴Institute for Hygiene and the National Consulting Laboratory on Hemolytic Uremic Syndrome, University of Münster, Münster, Germany

⁵Academic Renal Unit, University of Bristol, Southmead Hospital, Bristol, UK

Background: Infections with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are a primary cause of hemolytic uremic syndrome (HUS). Recently, Shiga toxin 2 (Stx2), the major virulence factor of EHEC, was reported to interact with complement, implying that the latter is involved in the pathogenesis of EHEC-induced HUS.

The aim of the present study was to investigate the effect of Stx2 on the expression of membrane-bound complement regulators CD46, CD55 and CD59 on two different human cell lines involved in HUS, proximal tubular epithelial (HK-2) and glomerular endothelial (GEnC) cells.

Methods: Shiga toxin 2 was added to glomerulum endothelial and tubular epithelial cells for 4 h and expression of membrane bound complement regulators CD46, CD55 and CD59 was measured by flow cytometry. In the case of downregulation, the respective receptor was determined in the supernatant by ELISA to assess any cleavage from the cell surface. In addition, modifications of complement regulator expression were correlated to intracellular mRNA levels using RT-qPCR. Furthermore, deposition of terminal complement complex on the cell surface was determined by flow cytometry.

Results: Incubation with Stx2 did not influence the amount of CD46 and CD55 on the surface of HK-2 cells and revealed only a slight reduction of both regulators on GEnC cells. In contrast, CD59 was significantly reduced by half on GEnC cells, but less pronounced on HK-2 cells. With increasing amounts of Stx2 reduction of CD59 also reached significance in HK-2 cells. ELISA analyses showed that CD59 was not present in supernatant of Stx2-treated cells, implying that CD59 reduction was not caused by cleavage from the cell surface. In contrast, RT-qPCR analyses showed downregulation of CD59mRNA as probable reason for CD59 reduction on the cell surface. In addition, an increase in terminal complement complex deposition on HK-2 cells was observed after treatment with Stx2, as possible consequence of CD59 downregulation.

Conclusion: In summary, Stx2 downregulates CD59 on mRNA and protein levels on tubular epithelial and glomerular endothelial cells which likely contributes to complement activation and kidney destruction in EHEC-associated HUS.

III.

Status quo der Shiga Toxin-Rezeptorforschung: humane mikrovaskuläre Endothelzellen im Fokus

Johannes Müthing¹, Andreas Bauwens¹, Josefine Betz¹, Iris Meisen¹, Björn Kemper² und Helge Karch¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

² Centrum für Biomedizinische Optik und Photonik, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 45, D-48149 Münster

e-Mail: jm@uni-muenster.de

Keywords: Shiga Toxine, Glykolipide, Massenspektrometrie, Lipid Rafts

Shiga Toxin (Stx)-produzierende *E. coli* (STEC) verursachen wässrige oder blutige Durchfallerkrankungen und einige besonders virulente Stämme das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) [1]. Stx zählen zu den AB₅-Toxinen, wobei die A-Untereinheit die zellschädigende Komponente des Toxins darstellt, während das B-Pentamer für die zelluläre Bindung und Rezeptor-vermittelte Endozytose verantwortlich ist. Stx schädigen bevorzugt mikrovaskuläre Endothelzellen der Niere und des Gehirns [2] mit fatalen Folgen.

Die von uns bisher analysierten Stx-Varianten der Subtypen Stx1a, Stx2a und Stx2e binden in unterschiedlichem Ausmaß an die Glycosphingolipide (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer). Als „neuer“ Stx-Rezeptor wurde von uns das Forssman GSL (Pentahexosylceramid) identifiziert [3], an das (neben Gb3Cer und Gb4Cer) ausschließlich Stx2e-Varianten binden. Da die GSL-Rezeptoren nicht als singuläre Moleküle, sondern in „geclusteter“ Form in „Lipid Rafts“ in der Plasmamembran vorliegen, kommt dem Ceramid (Lipidanker) der GSL wahrscheinlich eine funktionelle Bedeutung hinsichtlich Bindung und Internalisierung der Stx zu.

Der Mechanismus, über den die Stx auf Endothelzellen der Niere und des Gehirns übertragen werden, ist nach wie vor unklar, wobei Lipoproteine im menschlichen Blut aufgrund ihres Gehaltes an Stx-Rezeptoren eventuell als Stx-Transporteure in Frage kommen. Dieser Beitrag informiert zum aktuellen Stand der Stx-Forschung hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die der Stx-vermittelten Schädigung des renalen und cerebralen Endothels des Menschen zugrunde liegen.

[1] Karch H, Müthing J, Dobrindt U, Mellmann A. Evolution und Infektionsbiologie der mit dem hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) assoziierten *E. coli* (HUSEC). Bundesgesundheitsbl 2013; 56: 8-14.

[2] Bauwens A, Betz J, Meisen I, Kemper B, Karch H, Müthing J. Facing glycosphingolipid–Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. Cell Mol Life Sci 2013; 70: 425-457.

[3] Müthing J, Meisen I, Zhang W, Bielaszewska M, Mormann M, Bauerfeind R, Schmidt MA, Friedrich AW, Karch H. Promiscuous Shiga toxin 2e and its intimate relationship to Forssman. Glycobiology 2012; 22: 849-862.

IV.

Die Expression spezifischer Glykosyltransferasen und der Gehalt an Shiga Toxin-bindenden Glykosphingolipiden bestimmen die Toxinsensitivität von humanen lymphoiden und myeloiden Zellen

Ivan U. Kouzel¹, Andreas Bauwens¹, Martina Bielaszewska¹, Christoph Cichon²,
M. Alexander Schmidt², Helge Karch¹ und Johannes Müthing¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

² Institut für Infektiologie, Universität Münster, Von-Esmarch-Straße 56, D-48149 Münster
e-Mail: ivan.kouzel@uni-muenster.de

Keywords: Shiga Toxin, Zytotoxizität, Glykosphingolipide, Lipid Rafts

Die Glykosphingolipide (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosyl-ceramid (Gb4Cer) stellen die hoch- bzw. niedrigaffinen Rezeptoren für Shiga Toxine (Stx) dar, die von Stx-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) freigesetzt werden und vorrangig humane Endothelzellen schädigen [1]. Da Leukozyten als Stx-Transporteure im Blutkreislauf des Menschen in Frage kommen, wurden von uns vier humane Zelllinien leukozytären Ursprungs auf ihren Gehalt an Gb3Cer und Gb4Cer sowie auf ihre Expression der Rezeptor-relevanten Glykosyltransferasen und auf das Vorkommen der GSL-Rezeptoren in Lipid Rafts untersucht.

In einem Overlayverfahren wurden in Kombination mit der Massenspektrometrie in Raji-Zellen (B-Zellabkömmling) Gb3Cer-Varianten mit C16:0-, C24:0- und C24:1-Fettsäuren und in THP-1 Zellen (Monozyten-Äquivalent) neben diesen Gb3Cer-Spezies zusätzlich noch die korrespondierenden Gb4Cer-Varianten identifiziert [2]. In beiden Zelllinien konnten Stx-Rezeptoren in Lipid Raft-analogen Detergenz-resistenten Membranen (DRM) und die Expression der für die Biosynthese von Gb3Cer und Gb4Cer verantwortlichen Glykosyltransferasen nachgewiesen werden. Jurkat und HL-60-Zellen, die T-Zell- bzw. Granulozyten-Abkömmlingen entsprechen, besitzen keine Stx-Rezeptoren und exprimieren keine der für die Biosynthese von Gb3Cer und Gb4Cer erforderlichen Glykosyltransferasen. Die Zytotoxizitätsstudien mit Stx2a ergaben, dass nur die Rezeptor-positiven Raji- und THP-Zellen gegenüber Stx2a sensitiv waren, was mit den Ergebnissen der GSL-Bestimmung und Glykosyltransferasen-Expression korreliert [3]. Diese Daten belegen, dass Rezeptor-GSL der Globo-Serie essentiell für eine Stx-verursachte Zellschädigung sind.

[1] Müthing J, Schweppe CH, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost* 2009; 101: 252-264.

[2] Hoffmann P, Hülsewig M, Duvar S, Ziehr H, Mormann M, Peter-Katalinić J, Friedrich AW, Karch H, Müthing J. On the structural diversity of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in lymphoid and myeloid cells determined by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; 24: 1-10.

[3] Kouzel IU, Pohlentz G, Storck W, Radamm L, Hoffmann P, Bielaszewska M, Bauwens A, Cichon C, Schmidt MA, Mormann M, Karch H, Müthing J. Association of Shiga toxin glycosphingolipid receptors with membrane microdomains of toxin-sensitive lymphoid and myeloid cells. *J Lipid Res* 2013; 54: 692-710.

V.

Expression des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG in Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*-Stämmen

Thorsten Kuczius, Wenlan Zhang, Alexander Mellmann, Helge Karch

Institut für Hygiene, Universität und Universitätsklinikum Münster, Robert Koch Str. 41, 48149 Münster

e-Mail: tkuczius@uni-muenster.de.

Keywords: STEC, EibG, Proteinexpression, Regulation

Zahlreiche Bakterienarten sind in der Lage, Oberflächenproteine zu exprimieren, die mit Immunglobulinen interagieren. In einigen Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) Stämmen wurden die Gene *eibG* und *eibC* identifiziert, die für derartige Interaktionsproteine kodieren [1]. Die Proteine der Eib-Familie (*E. coli* Immunglobulin-bindende Proteine) binden an humanes IgG und IgA sowie an das Fc-Fragment von Immunglobulinen. EibG ist zudem für die Ausbildung von kettenförmigen Agglomeraten und für die Adhäsion an humane Epithelzellen verantwortlich.

Die Wechselwirkungen der Eib-Proteine mit Immunglobulinen wurden häufig kontrovers diskutiert, da der Nachweis durch die geringen Eib-Expressionsraten häufig am Detektionslimit lag. Intensive Studien einer biologischen Funktion des Proteins wurden mit rekombinant hergestellten und überexprimierten Eib-Proteinen durchgeführt. Für eine phänotypische Charakterisierung von EibG-Wildtypstämmen ist jedoch die natürliche Synthese des Proteins in ausreichend detektierbaren Mengen von großer Bedeutung.

In dieser Studie wurde die Expression und Regulation der Synthese des EibG-Proteins unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Es zeigte sich, dass die Synthese des EibG-Proteins besonders bei statischer Anzucht hoch-reguliert wurde. In Schüttelkultur beeinflussen Scherkräfte die Expression des Proteins; die EibG-Menge lag unter diesen Bedingungen an oder unterhalb der Detektionsgrenze.

Der Mechanismus einer „up- und down-regulation“ mit unterschiedlich hohen EibG-Protein-Mengen in STEC-Stämmen erlaubt nun spezifische und gezielte Untersuchungen der biologischen EibG-Proteinfunktion und der Interaktion mit eukaryontischen Zellen.

[1] Merkel V, Ohder B, Bielaszewska M, Zhang W, Fruth A, Menge C, Borrmann E, Middendorf B, Müthing J, Karch H, Mellmann A. Distribution and phylogeny of immunoglobulin-binding protein G in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its association with adherence phenotypes. *Infect. Immun.* 2010; 78: 3625-3636.

VI.

SNP-Typisierung und Krankheitsassoziation von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O26:H11/H⁻

Stefan Bletz, Martina Bielaszewska, Wenlan Zhang, Shana Leopold, Robin Köck, Helge Karch, Alexander Mellmann

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

Keywords: O26, SNP-Typisierung, Phylogenie

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) stellen eine humanpathogene Untergruppe von Shigatoxin-produzierenden *E. coli* dar. Weltweit ist EHEC O157:H7 der häufigste Serotyp bei Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS); jedoch werden hierzulande ca. 50% der HUS-Fälle durch non-O157:H7 verursacht. Unter diesen non-O157 Serotypen ist EHEC O26:H11 am häufigsten [1, 2]. Im Gegensatz zu den gut untersuchten EHEC O157:H7 ist nur wenig über die Phylogenie und Pathogenität von EHEC O26:H11/H⁻ bekannt. Wir untersuchten daher 48 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in 116 O26:H11/H⁻-Isolaten von Patienten mit wässrigem Durchfall, blutigem Durchfall und HUS über einen Zeitraum von mehr als vier Jahrzehnten.

Die SNPs wurden, basierend auf Shotgun-Genomsequenzierungsdaten, von 10 repräsentativen O26:H11/H⁻-Stämmen ausgewählt. Durch Mapping dieser Stämme zum Chromosom des EHEC O26:H11 str. 11368 (als Referenzsequenz in dieser Studie, GenBank NC_013361) wählten wir 48 SNPs in 47 Loci aus, die zufällig über das Chromosom verteilt lagen. Für den nachfolgenden SNP-Nachweis in 106 klinischen O26-Isolaten wurde mit Hilfe der PrimerPlex 2.6 Software (PREMIER Biosoft, Palo Alto, USA) ein Multiplex-Assay basierend auf der Luminex xMAP-Technologie (Luminex Corporation, Austin, USA) entwickelt und dieser auf einem MAGPIX-System gemessen. Die phylogenetischen Analysen wurden mit der SeqSphere Software Version 0,9 beta (Ridom GmbH, Münster) durchgeführt.

Alle ausgewählten SNPs sind biallelische Polymorphismen; 30 davon sind nicht-synonym und 18 sind synonym im Vergleich zur Sequenz des Referenzstamms. Insgesamt zeigten die 116 klinischen O26-Isolate 10 verschiedene SNP-Profile. Die SNP-Analyse wurde innerhalb von 8 Stunden durchgeführt, wobei 12 SNPs in 47 Isolaten simultan detektiert werden konnten. Stämme, die sich in maximal 3 SNPs unterschieden, wurden in 4 verschiedene SNP-klonale-Komplexe (SNP-CC) 1-4 zusammengefasst. Die Mehrheit der Stämme befindet sich in SNP-CC 2 und 3 (59 und 36 Isolate), wohingegen 8 und 13 Isolate in SNP-CC 1 bzw. 4 gruppiert wurden. Wir beobachteten eine signifikante Assoziation der klinischen HUS-Fälle (47 von 76) mit den Isolaten aus SNP-CC2 (Odds Ratio 3,78, 95% Konfidenzintervall 1,55 – 9,35, $p < 0,01$).

Unser neues SNP-basiertes Typisierungsschema ermöglicht eine schnelle, kostengünstige und exakte Subtypisierung von EHEC O26:H11/H⁻, das zur weiteren Charakterisierung der Ausbreitung und Evolution von EHEC O26 eingesetzt werden kann. Darüber hinaus kann durch die SNP-Typisierung eine Risikoabschätzung erfolgen.

[1] Mellmann et al., Emerg Infect Dis 2008

[2] Bielaszewska et al., Clin Infect Dis 2013



Abstracts – Poster

Epidemiologie und Klinik

- I. Post-Ausbruchs-Surveillance für sporadische Fälle von Infektionen mit EHEC O104:H4 in Deutschland, 04. Juli bis 31. Dezember 2011
C. Frank et al., Berlin
- II. Antibiotika-Resistenzen bei EHEC O26, O91 und O111
A. Kossow et al., Münster
- III. Neonatal hemolytic uremic syndrome after mother-to-child transmission of a low virulent *stx2b* harbouring Shiga toxin producing *Escherichia coli*
H. Hächler et al., Zürich
- IV. LGL-EHEC-Laborbefunde und Bayerische EHEC-Meldedaten 2012. Wie bilden sich die Befunde in der Meldedatenbank ab?
R. Konrad et al., Oberschleißheim
- V. EHEC notifications in the background of the EHEC/EAEC O104:H4 outbreak in 2011 in Germany and further differentiation of the isolates
A. Fruth et al., Wernigerode

Nachweisverfahren und Diagnostik

- VI. Charakterisierung Shiga Toxin-produzierender *E. coli* Isolate aus Urinproben von Patienten mit nosokomialen Harnwegsinfektionen
U. Dobrindt et al., Münster
- VII. Einfluss endokrin wirksamer Substanzen auf die Transkription von Shiga Toxin Genen
W. Zhang et al., Münster
- VIII. Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität eines immunchromatografischen Schnelltests zum Nachweis von Shigatoxin 1 und/oder Shigatoxin 2 aus humanen Stuhlproben
Neubauer et al., Graz
- IX. A molecular based *E. coli* serotyping system using oligonucleotide microarrays
G. Weissensteiner et al., Graz
- X. Unterscheidung von *E. coli* auf Ebene der O-Antigene mittels Infrarotspektroskopie
N. Mauder, Stuttgart
- XI. Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of Shiga toxin 1 and 2 gene subtypes
R. Stephan et al., Zürich
- XII. Etablierung einer Multiplex Real-Time PCR zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157
H. Adam et al., Oberschleißheim
- XIII. Optimierung der Kolonieblot-Hybridisierung zum simultanen Nachweis von Shigatoxin 1 /*stx1* und 2 /*stx2* bei EHEC
I. Huber et al., Oberschleißheim
- XIV. Untersuchungen zum Nachweis von HUSEC 41 (*E. coli* Serovar O104:H4) aus Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs
F. Düker et al., Gießen

EHEC und Lebensmittel

- XV. Überleben von STEC O26-Isolaten in Rohwurstprodukten
R. Pichner et al., Kulmbach
- XVI. Fate of Shiga toxin-producing and generic *E. coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese
J. Hummerjohann et al., Bern
- XVII. Validation and application of real-time PCR screening for the most pathogenic STEC groups in raw mild cheese
J. Hummerjohann et al., Bern
- XVIII. Crossing borders and crossing disciplines: Expertenworkshop und Krisenseminar zum Ausbruch eines zoonotischen Infektionserregers in der deutsch-niederländischen Grenzregion
R. Schmithausen et al., Bonn
- XIX. Vergleich von STEC-Isolaten aus Lebensmitteln mit humanen HUSEC-Stämmen
E. Hauser et al., Stuttgart

EHEC in Tier und Umwelt

- XX. Überleben von *E. coli* O104:H4 und O157:H7 in Oberflächenwasser
A. Martin et al., Berlin
- XXI. Shiga toxin subtypes associated with Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains isolated from hunted red deer, roe deer, chamois and ibex in Switzerland
R. Stephan et al., Zürich

Pathogene *E.coli*

- XXII. Klonale Verwandtschaft enteroaggregativer *E. coli* in Sachsen
S. Hauswaldt et al., Lübeck
- XXIII. Case of urinary tract infection and sepsis caused by enteroaggregative *E. coli* after diarrhea
M. Nüesch-Inderbinen et al., Zürich

XXIV. Prüfung einer rekombinanten Stx2e-Toxoidvakzine in Feldversuchen am Zieltier Schwein

O. Bastert et al., Dessau-Roßlau

XXV. Vorkommen und Virulenz-Charakterisierung von *E. coli* EHEC/EAEC Hybrid-Pathovaren in Deutschland 2008-2011

R. Prager et al., Wernigerode

Pathogenitätsfaktoren und Genomics

XXVI. Instabilität des pAA-Virulenzplasmids im *E. coli* O104:H4-Ausbruchsstamm 2011

L. Kunsmann et al., Münster

XXVII. Sensitivitätsunterschiede von mikro- und makrovaskulären Endothelzelllinien auf Shiga Toxin 1 und Shiga Toxin 2

A. Bauwens et al., Münster

XXVIII. Antitumor-Aktivität von Shiga Toxin gegenüber Gb3Cer/CD77-exprimierenden humanen Karzinomzelllinien des Pankreas

G. Pohlentz et al., Münster

XXIX. Interaktion von Shiga Toxin 2e mit Glykosphingolipid-Rezeptoren porciner Endothelzellen: Modell für die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke

I. Meisen et al., Münster

XXX. Strukturaufklärung der Shiga Toxin-Rezeptoren von Verozellen und Expressionsanalyse der Rezeptor-relevanten Glykosyltransferasen

C.-L. Schepers et al., Münster

XXXI. Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin-Rezeptoren humaner Nierendothelzellen mit ungewöhnlicher molekularer Anordnung in der Zellmembran

M. Mormann et al., Münster

XXXII. Identifizierung der Substratbindungsdomänen des Typ III Effektorproteins NleD

K. Kreuzburg, Melbourne

XXXIII. Human plasmatic coagulation is significantly impaired by EHEC-derived Shiga toxin 2

M. Berktold et al., Innsbruck

XXXIV. Comparative analysis of wildtype ESBL- *E. coli* strains and their plasmid-cured variants (PCV)

K. Schaufler et al., Berlin

I.

Post-Ausbruchs-Surveillance für sporadische Fälle von Infektionen mit EHEC O104:H4 in Deutschland, 4. Juli bis 31. Dezember 2011

Christina Frank, Astrid Milde-Busch, Dirk Werber

Robert Koch-Institut, FG35, DGZ-Ring 1, 13086 Berlin

e-Mail: Christina Frank

Keywords: EHEC, STEC, O104, HUS, Ausbruch

Der große und ungewöhnliche Ausbruch von Gastroenteritis und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) O104:H4 in Deutschland im Jahr 2011 wurde nach einer Phase ohne weitere Fälle mit dem 4. Juli 2011 als beendet erklärt. Es war zu diesem Zeitpunkt unklar, ob in der Zukunft wieder Infektionen mit diesem Erreger auftreten würden.

Post-Ausbruchs-Surveillance, basierend auf der gesetzlichen Meldepflicht für EHEC-Infektionen und HUS, wurde durch Expositionsfragebögen ergänzt und bis Ende des Jahres 2011 durchgeführt. An das Robert Koch-Institut übermittelte Infektionen mit EHEC der Serogruppe O104 (asymptomatische Infektionen, Fälle von Gastroenteritis oder HUS) wurden als bestätigte „Post-Ausbruchsfälle“ angesehen, wenn zusätzlich vorliegende Erregerdetails nicht gegen eine Infektion mit dem Ausbruchsstamm sprachen. Unter Kontaktpersonen von Ausbruchsfällen wurden symptomatische Infektionen ohne Labornachweis der Serogruppe O104, aber ohne Informationen, die gegen den Ausbruchsstamm sprachen, als wahrscheinliche Post-Ausbruchsfälle gewertet. Bei derselben Konstellation von Laborergebnissen wurden HUS bei Erwachsenen als mögliche Post-Ausbruchsfälle gezählt.

In der Post-Ausbruchs-Surveillance wurden mit abnehmender Frequenz 29 bestätigte oder wahrscheinliche, sowie 4 mögliche Fälle von Infektionen mit dem Ausbruchsstamm gezählt – die meisten waren erkennbar Folgefälle zu bekannten Ausbruchsfällen und ereigneten sich häufig im Haushalt. Der letzte Erkrankungsbeginn unter den hier beschriebenen Fällen war der 11. November 2011. Keiner der Fälle konnte auf Sprossenverzehr zurückgeführt werden. Die meisten Infektionen hatten erkennbare Verbindungen zu Ausbruchsfällen – teilweise allerdings mit 2-3 Monate langen Zeitperioden zwischen den Erkrankungsbeginn des Primär- und des Sekundärfalles. In der Beobachtungsperiode traten keine bestätigten HUS, aber ein wahrscheinlicher Fall von HUS bei der Mutter eines Kindes auf, welches im Ausbruch ein HUS hatte. Fünf bestätigte und ein wahrscheinlicher Fall gehören zu einem nosokomialen Cluster: 4 Sekundärfälle, die im Krankenhaus engen Kontakt zu einer im Ausbruch erkrankten Patientin hatten, die offenbar den Ausbruchsstamm noch Wochen später ausschied als bei ihr eine Darmspiegelung vorgenommen wurde, bzw. 2 Tertiärfälle unter Haushaltskontakten der Sekundärfälle. Drei Fälle von Gastroenteritis gehen auf den Umgang mit erregerhaltigen Untersuchungsmaterialien in Laboren zurück.

Das nosokomiale Cluster bestätigt, dass auch langanhaltendes Ausscheiden des Erregers nach der Genesung ein Risiko für Folgeinfektionen birgt. Leider kehrte die Ausführlichkeit der durchgeführten und übermittelten Labordiagnosen von EHEC-Infektionen schnell zur dürftigen Vor-Ausbruchs-Qualität zurück. Aus der Post-Ausbruchs-Surveillance ergab sich insgesamt jedoch kein Hinweis darauf, dass sich der Erreger in Deutschland in der Umwelt eingemischt hat.

II.

Antibiotika-Resistenzen bei EHEC O26, O91 und O111

Annelene Kossow, Helge Karch und Alexander Mellmann

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

Keywords: Antibiotika-Resistenzen, ESBL

Im Frühjahr 2011 kam es in Deutschland zu dem bisher größten Ausbruch durch den EHEC-Serotyp O104:H4 [1]. Charakteristisch für den Ausbruchstamm war dessen Expression von Extended spectrum β -Laktamasen (ESBL) und die daraus resultierenden Resistenzen gegen alle Penicilline und Cephalosporine [2]. Antibiotikaresistente Erreger sind zu einem weltweiten Problem geworden, das sowohl die sich entwickelnden Länder als auch hochtechnologisierte Nationen betrifft [3]. Wenig Aufmerksamkeit wird bisher dem Resistenzprofil von EHEC Isolaten geschenkt. Unklar ist auch, ob Resistenzen zunehmen und bei jüngeren Isolaten vermehrt auftreten. Aus diesem Grund untersuchten wir 31 O26-, 100 O91- und 80 O111-Stämme aus der Stammsammlung des Instituts für Hygiene des Universitätsklinikums Münster im Hinblick auf ihre Resistenzeigenschaften. Phänotypische Empfindlichkeit gegen Ampicillin (AMP), Cefuroxim (CXM), Cefotaxim (CTX), Cefpodoxim (CPD), Ceftazidim (CAZ), Piperacillin/Tazobactam (TZP), Tigecyclin (TGC), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Trimetoprim/Sulfamethoxazol (SXT), Ciprofloxacin (CIP), Nitrofurantoin (F) und Fosfomycin (FOT) wurde mit Hilfe der Agardiffusionsmethode nach EUCAST bestimmt [4]. Ein genotypisches Screening auf die Resistenzgene *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*CTX-M und *bla*OXA erfolgte mit einem Multiplex-PCR Ansatz nach Fang et al. [5]. Von den 31 O26-Isolaten zeigten drei Isolate eine phänotypische AMP-Resistenz. Ein O26-Isolat war zusätzlich resistent gegen CXM, CTX, CPD, TZP und STX. Bei zwei der 72 O91-Isolate wurde *bla*TEM nachgewiesen. Phänotypisch zeigte sich eine Resistenz gegenüber AMP und STX. Resistenzen gegen AMP bzw. intermediäre Resistenz gegen AMP und CXM wurden für EHEC der Serogruppe O111 nachgewiesen (HUSEC012 bzw. HUSEC011). Vertiefende Untersuchungen zu den Resistenzmechanismen, die diesen Phänotypen zugrunde liegen, werden helfen, den möglichen Eintrag und die Verbreitung von ESBL-Resistenzdeterminanten frühzeitig in EHEC zu erkennen.

[1] RKI. Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Berlin: 2011.

[2] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Kock R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 671-676.

[3] WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action. Geneva: 2012.

[4] EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. 2012.

[5] Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 707-712

III.

Neonatal hemolytic uremic syndrome after mother-to-child transmission of a low virulent *stx2b* harbouring Shiga-toxin producing *Escherichia coli*

A. Stritt¹, L. Kottanattu¹, B. Bucher¹, S. Tschumi¹, M. Steinmann¹, N. von Steiger², R. Stephan³, H. Hächler^{3*}, G.D. Simonetti¹

¹ University Children's Hospital, Inselspital and University of Bern, Bern, Switzerland

² Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, Switzerland

³ Institute for Food Safety and Hygiene, National Centre for Enteropathogenic Bacteria and Listeria, University of Zürich, Zürich, Switzerland

* H. Hächler, Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zurich, Switzerland, Phone 0041-44-6358651, Fax 0041-44-6358908
E-mail haechlerh@fsafety.uzh.ch

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, neonatal HUS, mother-to-child transmission

The hemolytic-uremic syndrome (HUS), defined by the triad of microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure is the leading cause for acute renal failure in childhood. In more than 90% HUS is due to infections with Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and often presents with a diarrheal prodromi. Rarely, HUS can occur after infections with *Streptococcus pneumoniae* or is associated with either defective regulation of the alternative complement pathway, metabolic diseases (cobalamin C disorders) or a decrease in the von Willebrand factor-cleaving protease (Upshaw-Schulman syndrome) that presents mostly as thrombotic thrombocytopenic purpura. These cases of HUS, known as atypical HUS, are characterized by frequent relapses and lead often to chronic renal failure. Neonatal cases of HUS are usually related to atypical HUS; yet, neonatal cases of HUS due to Shiga-toxin producing *E. coli* have been anecdotally reported.

We describe the case of a newborn boy presenting with HUS linked to a *stx2b* harbouring Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) O146:H28. STEC O146:H28 was linked so far with asymptomatic carriage in humans. Based on strain characteristics and genotyping data, the mother was a healthy carrier, who transmitted the STEC to the newborn during delivery.

IV.

LGL-EHEC-Laborbefunde und Bayerische EHEC-Meldedaten 2012 - Wie bilden sich die Befunde in der Meldedatenbank ab?

*Regina Konrad, Annette Heißenhuber, Jasmin Fräßdorf, Marion Lindermayer, Katja Meindl,
Sabine Wolf, Anja Berger, Andreas Sing, Wolfgang Hautmann*

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Werden in einem Untersuchungslabor EHEC-Bakterien bei einem Patienten direkt oder indirekt nachgewiesen, muss gemäß Infektionsschutzgesetz in Deutschland der Befund vom Labor an das zuständige Gesundheitsamt gemeldet werden. Das Gesundheitsamt führt Ermittlungen durch, prüft, ob die Befunde den Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts (RKI) entsprechen, und übermittelt, sofern die Falldefinition erfüllt ist, die Angaben inklusive Labordaten im Falle Bayerns an die Meldezentrale im Landesamt für Gesundheit (LGL), die dann die Daten an das RKI weiterleitet.

In der Vergangenheit zeigte sich, dass Labormeldungen von EHEC häufig nicht der RKI-Falldefinition entsprechen. Außerdem wurde während des EHEC O104:H4- Ausbruchs 2011 deutlich, dass von der Befundmitteilung bis zur Übermittlung an das RKI zu viel Zeit vergeht, um schnell ein Ausbruchsgeschehen identifizieren und eingrenzen zu können. Insbesondere wichtige zusätzliche epidemiologische Informationen wie z.B. der Serotyp wurden entweder gar nicht oder verspätet übermittelt.

Ziel dieser Studie ist ein Abgleich der EHEC-Laborbefunde des LGL mit den bayerischen EHEC-Meldedaten für das Jahr 2012. Es wurde untersucht, welcher Anteil der insgesamt in Bayern im Jahr 2012 registrierten EHEC-Fälle im LGL-Labor untersucht wurde und wie sich die LGL-Befunde in der Meldedatenbank abbilden. Aus den Ergebnissen soll abgeleitet werden, wo Verbesserungen in der Diagnostik, in der Meldung und Befundmitteilung und im Meldeweg möglich sind, um die EHEC-Nachweise schneller und präziser in den Meldedaten abzubilden.

V.

EHEC notifications in the background of the EHEC/EAEC O104:H4 outbreak in 2011 in Germany and further differentiation of the isolates

Angelika Fruth, Rita Prager, Antje Flieger

Robert Koch Institute, Division of Bacterial Infections, National Reference Centre for Salmonella and other bacterial enterics, Wernigerode

Keywords: EHEC, outbreak O104:H4, Germany

Germany has faced the largest outbreak of haemolytic uremic syndrome (HUS) ever in 2011. Between 20 May 2011 and 5 August 2011, a total of 3224 samples from suspected cases were sent to the NRC for Salmonella and other bacterial enterics at the RKI. 1023 strains were allocated to the outbreak by means of serovar determination, PCR of virulence factors, ESBL production and the resistance profile.

Throughout the outbreak, the laboratory provided serological and molecular expertise and technical support to primary diagnostic laboratories as well as to health professionals in order to confirm diagnosis.

Apart from the outbreak strain O104:H4, 87 EPEC and 702 EHEC cases were also identified as additional *E. coli* pathogens. A total of 311 of these EHEC isolates and 53 of the EPEC isolates could be allocated to 42 different serotypes with very different virulence patterns. Approximately 4% of these samples were able to grow on ESBL-selective media (i.e. ESBL-Brilliance; Biomerieux).

The distribution of the EHEC- serotypes showed an amount of 17% O91, followed by 16% O157, 11% O103, 8% O26, 4% O146, 3% O145, 25% of other serotypes and 16% of rough and non-typeable strains.

Molecular typing of the isolates identified two small O157-clusters (14 and 7 isolates, non HUS) and one O26-cluster (3 HUS and 1 patient with clinical symptoms of diarrhea).

[1] Robert Koch-Institut, 2011. Bericht zu bakteriologischen Untersuchungen im Rahmen des EHEC O104:H4-Ausbruchs. Epid. Bull. 35

[2] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis. 11(9), 671-676. Epub 2011 Jun 22.

[3] Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G; HUS Investigation Team, 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. N. Engl. J. Med. 365(19):1771-1780

VI.

Charakterisierung Shiga Toxin-produzierender *E. coli* Isolate aus Urinproben von Patienten mit nosokomialen Harnwegsinfektionen

Francisco Toval¹, Roswitha Schiller^{1,2}, Florian Wagenlehner³, Martina Bielaszewska¹, Helge Karch¹, Johannes Müthing¹, Ulrich Dobrindt¹

¹Institut für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

²Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

³Klinik für Urologie, Pädiatr. Urologie & Andrologie, Justus-Liebig-Universität Giessen

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), Shiga toxin, Gb3Cer, Gb4Cer

Hintergrund: Die überwiegende Mehrheit aller Harnwegsinfektionen (HWI) wird durch uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) verursacht, einem Subtyp der sog. extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC). Obwohl viele pathogene *E. coli* Isolate aufgrund ihres Virulenzgehaltes bestimmten Pathotypen zugeordnet werden können, gibt es dennoch Überlappungen in der Verbreitung von Virulenzgenen zwischen Pathotypen. Viele UPEC können nicht eindeutig von Durchfall verursachenden Varianten, sog. intestinal pathogenen *E. coli* (IPEC), oder von Kommensalen unterschieden werden [1]. Ziel unserer Studie war die Charakterisierung atypischer UPEC Isolate nosokomialer HWIs.

Material und Methoden: Wir untersuchten 102 *E. coli* Isolate von Krankenhauspatienten mit Verdacht auf nosokomiale HWI. Diese Isolate wurden mittels Multiplex-PCR auf die Anwesenheit wichtiger UPEC und IPEC Virulenzdeterminanten getestet. Zusätzlich erfolgte eine Multi-Lokus Sequenz-typisierung (MLST). Ausgewählte Stämme wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung, Motilität, Adhärenz sowie die Expression von Virulenzfaktoren untersucht. Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) Urinisolate wurden zudem in einem experimentellen HWI Modell getestet. Zytotoxizitätsassays wurden durchgeführt, um die Suszeptibilität von T24 Harnblasenepithel- und Verozellen gegenüber Shiga Toxinen dieser Isolate zu vergleichen. Wir extrahierten neutrale Glykosphingolipide (nGSL) aus T24 Zellen, um die Anwesenheit und Funktion von nGSLs als Shiga Toxin-Rezeptoren zu untersuchen.

Ergebnisse: Interessanterweise identifizierten wir drei Urinisolate mit STEC Eigenschaften. Diese Stämme unterschieden sich in ihrem STEC Virulenzgen-repertoire, Serotyp, phylogenetischen Hintergrund und Virulenz- oder Fitness- assoziierten Phänotypen. Ein Isolat zeigte lokalisierte Adhärenz (LA) an humanen T24 Zellen (humanes Blasenepithel), dem typischen Adhärenzmuster von STEC an Vero Zellen. T24 Zellen erwiesen sich im Zytotoxizitätstest als weniger empfindlich gegenüber Shiga Toxinen als Vero Zellen. nGSLs wurden aus T24 Zellen isoliert und durch Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Unter den isolierten nGSLs aus T24 Zellen konnten wir Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer) nachweisen und zeigen, dass das Shiga Toxin 2 (Stx2) eines STEC Urinisolats bevorzugt an Gb3Cer, aber auch an Gb4Cer, bindet.

Diskussion: Nosokomiale HWIs können durch eine Vielzahl verschiedener *E. coli* Varianten verursacht werden, in manchen Fällen sogar von STEC. Die in unserer Studie identifizierten STEC Isolate ähneln typischen STEC Varianten, die das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) verursachen können. Der Nachweis der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer in Membranen von T24 Blasenepithelzellen und ihrer Erkennung durch Stx2 wirft die Frage auf, inwieweit typische STEC Virulenzfaktoren auch an der Etablierung einer HWI beteiligt sein können.

[1] Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int J Med Microbiol. 2011;301:642-647.

VII.

Einfluss Endokrin wirksamer Substanzen auf die Transkription von Shiga Toxin Genen

Wenlan Zhang, Julia Sudmann, Werner Mathys, Helge Karch

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

Keywords: Toxininduktion, *E. coli*, real-time PCR, EHEC

Endokrin wirksame Substanzen (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) reichern sich im gesamten Ökosystem an und beeinträchtigen das endokrine Gleichgewicht. Häufig weisen die Substanzen hinsichtlich ihrer endokrinen Effekte Ähnlichkeiten mit der Wirkung weiblicher Sexualhormone auf. Die EDCs stammen überwiegend aus industriellen Quellen und gelangen in die Nahrungskette des Menschen. Aus der Gruppe der EDCs haben wir Bisphenol A (BPA), 4-Nonylphenol (NP) und β -Estradiol-3,17-Disulfat (β -EDS) hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Shiga Toxin (Stx) Transkription und Expression in EHEC O157:H7 untersucht.

Nach EDC-Exposition der Bakterien wurden Transkriptionsanalysen definierter Toxingene mit Hilfe der relativen quantitativen One-Step real-time RT-PCR durchgeführt. Die mRNA-Amplifikation von *stx*₁ und *stx*₂ zeigte einen positiven Einfluss der EDCs auf die Expression der Virulenzgene. Kulturüberstände der EHEC, die zuvor mit EDCs inkubiert wurden, zeigten im Verozelltest eine gesteigerte zytotoxische Aktivität, die auf einer erhöhten Stx-Produktion beruhte. Die EDCs zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer stimulierenden Wirkung auf die Stx-Gene. Weiterhin wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Wirkungsweise festgestellt. Unsere Ergebnisse belegen eine in vitro-Wirkung von EDCs auf die Stx-vermittelte Pathogenität von EHEC. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um Aussagen über die molekularen Wirkmechanismen treffen zu können.

[1] Karch, H., P. I. Tarr and M. Bielaszewska. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 405-418.

[2] Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M. J. Mac, C. Maczka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. M. Sheehan, T. Sinks and H. A. Tilson. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 1996; 104 Suppl 4: 715-740.

[3] Kim, Y. S., J. Min, H. N. Hongz, J. H. Park, K. S. Park and M. B. Gu. Analysis of the stress effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17: 1390-1393.

VIII.

Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität eines immun-chromatographischen Schnelltests zum Nachweis von Shigatoxin 1 (Stx1) und/oder Shigatoxin 2 (Stx2) aus humanen Stuhlproben

Sabine Neubauer¹, Nadine Hiden¹, Sabine Schlager¹

¹ Nationale Referenzzentrale für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*, Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), Institut für Medizinische Mikrobiologie, Zentrum für Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten, Beethovenstraße 6, 8010 Graz, Austria

Keywords: Shigatoxine, immun-chromatographisch, Schnelltest

Für die Routinediagnostik klinischer Mikrobiologie-Laboratorien sind schnelle, unkompliziert abzuarbeitende Tests, die keine zusätzlichen Spezialgeräte benötigen, wichtig. Der immun-chromatographische Schnelltest „SHIGA TOXIN QUIK CHEK“ (TechLab[®] Inc.) stellt ein solches Testsystem dar, mit dem die gleichzeitige qualitative Detektion und Differenzierung von Shigatoxin 1 (Stx1) und Shigatoxin 2 (Stx2) mit einer Testvorrichtung möglich ist. Mit ihm können humane Stuhlproben direkt, Plattenkulturen oder mikrobielle Stuhlanreicherungen analysiert werden.

Vierunddreißig humane Stuhlproben wurden mit diesem Schnelltest analysiert und die Ergebnisse mit den Resultaten aus dem validierten VTEC-Screening-Prozedere der österreichischen Referenzzentrale für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli* (VTEC) verglichen.

Die VTEC-Detektion in der Referenzzentrale basiert auf dem Nachweis der Gene für Shigatoxin 1 (*stx1*) und/oder Shigatoxin 2 (*stx2*) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach flüssiger Voranreicherung und Kultivierung dieser Anreicherung auf verschiedenen selektiven und non-selektiven festen Nährböden [1].

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden vierzehn Proben, die mit der Referenzmethode VTEC-positiv getestet wurden, herangezogen. Wenn man den Schnelltest mit mikrobiellen Stuhlanreicherungen durchführte, konnten bei fünf Proben die entsprechenden Shigatoxine nachgewiesen werden. Neun Proben wurden jedoch als falsch negativ ausgewiesen, was lediglich eine Spezifität von 35,71 % ergibt. Von diesen fünf im Schnelltest mit Anreicherung durchgeführten positiv-getesteten Proben konnte, wenn man den Stuhl direkt einsetzte, nur mehr bei zwei Proben Shigatoxin nachgewiesen werden.

Die Spezifität wurde, mit zwanzig in der Referenzmethode VTEC-negativ getesteten Stuhlanreicherungen, ermittelt. Sie beträgt 100 %, da alle Anreicherungen mit dem Schnelltest ebenfalls ein Shigatoxin-negatives Ergebnis zeigten.

[1] Reischl U. et al. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(7): 2555-2565.

IX.

A molecular based *Escherichia coli* serotyping system using oligonucleotide microarrays

Karin Kienesberger¹, Oksana Ableitner¹, Sabine Neubauer¹, Gudrun Weissensteiner¹,
Sabine Schlager¹

¹ Nationale Referenzzentrale für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*, Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), Institut für Medizinische Mikrobiologie, Zentrum für lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten, Beethovenstraße 6, 8010 Graz, Austria

Keywords: *E. coli* Serotypie DNA, Oligonukleotid-Microarray

Introduction & objectives: Serotyping of *Escherichia (E.) coli* is important for epidemiological purposes and early assessment in outbreak situations. "Gold standard" is an agglutination procedure for O- and H-serotyping which, however, is very time-consuming [1]. The interpretation of results is challenging due to possible cross-reactions or masking of capsular antigens. Microarray technology circumvents these problems and allows serotyping of *E. coli* strains in a fast and reliable manner [2].

Material & methods: For this study we used customer designed oligonucleotide based microtube DNA microarrays (Identibac ArrayTubes™). The microarrays contained oligonucleotide DNA probes for the 24 epidemiologically most relevant O-specific genes as well as for 47 out of the 53 different H-antigen genes of *E. coli*. Extracted bacterial DNA was amplified and concomitantly labelled with biotin in a linear multiplex PCR reaction. Next, the biotin labelled linear PCR products were hybridized to the corresponding probes. Horseradish peroxidase (HRP)-streptavidin and SeramunGrün® were added and the coloured precipitate was detected with an ArrayTube™ Reader and further analyzed with the supplied software.

Results: First we evaluated the microarray technology with 18 well-characterized reference *E. coli* strains. The arrays showed 100% accordance with conventional O- and H-serotyping. Next, we genetically retyped 7 H-non-typeable, 15 H-rough and 8 H-non-motile *E. coli* strains sent to the National Reference Center for *Escherichia coli*. Different H-serotypes were determined for all of these 30 strains. The corresponding O-serotypes could not be identified for all of them, due to the fact that only the most relevant 24 O-specific genes are spotted on the array.

Conclusion: The microarray technology is a fast and reliable alternative to the conventional *E. coli* serotyping method. It allows identification of the H-serotypes and the 24 most relevant O-serotypes of *E. coli* strains and moreover reveals additional information about non-typeable strains, non-motile strains and strains showing the rough phenotype.

1. Orskov I., Orskov F., Jann B., Jann K. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. American Society of Microbiology 1977; 41(3): 667-710

2. Ballmer K., Bozena M. K., Kuhnert P., Slickers P., Ehricht R., Hächler H. Fast DNA serotyping of *Escherichia coli* by use of an oligonucleotide microarray. Journal of Clinical Microbiology 2007; 45(2): 370-379

X.

Unterscheidung von *Escherichia coli* auf Ebene der O-Antigene mittels Infrarotspektroskopie

Norman Mauder

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS), Schaflandstraße 3/2, 70736 Fellbach

Keywords: Infrarotspektroskopie, Antigen-Typisierung; Keywords: infrared spectroscopy, antigen typing

In der amtlichen Lebensmittelüberwachung ist die Untersuchung auf verotoxinbildende *E. coli* (VTEC) ein wichtiger Parameter der Routineuntersuchung. VTEC-Isolate werden zur Bestätigung an das nationale Referenzlabor am Bundesinstitut für Risikobewertung versandt. Hier können durch spezielle und z.T. aufwändige Methoden Typisierungen und Feintypisierungen durchgeführt werden, die auch eine Aufklärung von Infektionsketten möglich machen. Bei größeren Ausbruchsgeschehen, die oft ein massenhaftes Probenaufkommen bedingen (z.B. EAHEC O104:H4 im Jahre 2011), kann eine entsprechend effiziente Vorfilterung durch ein geeignetes Screening-Verfahren nützliche Dienste leisten.

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) ist eine in der Anwendung schnelle und kostengünstige Technologie, die seit Jahren erfolgreich bei der Identifikation und Differenzierung von grampositiven [1] wie gramnegativen [2] Mikroorganismen aus Lebensmitteln und veterinärmedizinischen Proben eingesetzt wird. Es wurde bereits gezeigt, dass *E. coli* Isolate mittels FTIR nach ihren O-Antigen-Typen unterschieden werden können [3]. Diese Beobachtung konnte am CVUAS bei diversen Keimen wie z.B. *Listeria*, *Yersinia*, *Salmonella* und *Escherichia* prinzipiell bestätigt werden. Am Beispiel von *E. coli* O104:H4 wird gezeigt, dass sich Patientenisolat des Ausbruchs von 2011 zusammen mit anderen O104 Isolat mit einer Sensitivität von 100% (43/43) und einer Spezifität von 99,7% (389/390) von VTEC-Isolaten mit anderen O-Antigenen unterscheiden lassen.

Die FTIR eignet sich in diesem Fall als schnelle Screening-Methode. Die Methodik lässt sich fallbezogen zum direkten Vergleich von Isolaten einsetzen.

[1] Rau J, Perz R, Klittich G, Contzen M. Cereulidbildende präsumtive *Bacillus cereus* aus Lebensmitteln - Differenzierende Untersuchungen mittels kultureller Methoden, LC-MS/MS, PCR und Infrarotspektroskopie unter Berücksichtigung thermotoleranter Vertreter. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2009; 122: 25-36

[2] Kuhm AE, Suter D, Felleisen R, Rau J. Identification of *Yersinia enterocolitica* on species and subspecies level by Fourier transform infrared spectroscopy; Appl Environ Microbiol 2009; 75:5809-5813

[3] Beutin L, Wang Q, Naumann D, Han W, Krause G, Leomil L, Wang L, Feng L. Relationship between O-antigen subtypes, bacterial surface structures and O-antigen gene clusters in *Escherichia coli* O123 strains carrying genes for Shiga toxins and intimin. J Med Microbiol 2007; 56: 2 177-184

XI.

Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of Shiga toxin 1 and 2 gene subtypes

Heike Margot¹, Nicole Cernela¹, Carol Iversen², Claudio Zweifel¹, Roger Stephan^{1*}

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

² Quality and Safety Department, Nestlé Research Centre, Vers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne, Switzerland

* R. Stephan, Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zurich, Switzerland, Phone 0041-44-6358651, Fax 0041-44-6358908, e-Mail: stephanr@fsafety.uzh.ch

Keywords: Shiga toxin gene subtypes, STEC detection, commercial real-time PCR systems, evaluation

Following the recent outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 in Germany, the demand for fast detection of STEC has again increased. Various real-time PCR based methods enabling detection of Shiga toxin genes (*stx*) have been developed. The current study evaluated the reliability of seven commercially available real-time PCR systems of Shiga toxin 1 and 2 gene subtypes. Additionally, convenience in performance of the seven real-time PCR systems was assessed. These real-time PCR systems intended for application in the field of food microbiology for detection were evaluated: GeneDisc® STEC and *E. coli* O157 applied on the GeneDisc® Cycler (Pall GeneDisc Technologies, Bruz, France), the Assurance GDS™ STEC applied on the GDS™ Rotor Gene (BioControl, Bellevue, WA, USA), the mericon VTEC *stx*_{1/2} applied on the Qiagen Rotor-gene Q (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland), the LightMix Kit EHEC applied on the LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Switzerland), the iQ Check STEC VirX™ (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) applied on the MiniOpticon, the BAX® System STEC Suite Screening Assay applied on the BAX® System Q7 (DuPont, Qualicon, Wilmington, DE, USA), and the ABI Custom TaqMan® VT1/VT2 Assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) applied on the 7500Fast real-time PCR system. Pure cultures of 18 STEC strains harboring all known *stx*₁ and/or *stx*₂ subtypes were tested. Only one of the seven evaluated real-time PCR systems detected all known *stx*₁ and *stx*₂ subtypes. Six systems failed to detect the *stx*_{2f} subtype. One system missed *stx*₂ subtypes reported in association with severe human disease. Since the presence of certain Shiga toxin genes (subtypes) is considered an important indicator of STEC virulence, systems differentiating between the *stx*₁ and *stx*₂ groups provide an added value. Reliable and fast detection of *stx* genes is thereby of major importance for both diagnostic laboratories and the food industry.

XII.

Etablierung einer Multiplex Real-Time PCR zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157

Hannah Adam^{1,2}, Jasmin Fräßdorf¹, Sabine Wolf¹, Marion Lindermayer¹, Daniela Sebah¹,
Corinna Wudy^{1,2}, Regina Konrad¹, Ingrid Huber¹, Andreas Sing¹, Erwin Märtlbauer²,
Ulrich Busch¹

¹ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

² Institut für Lebensmittelwissenschaft, Tierärztliche Fakultät, LMU München

Keywords: STEC, Serogruppen-Nachweis, real-time PCR

Jährlich erkranken in Deutschland rund 1.000 Menschen an enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Der Krankheitsverlauf kann sich dabei von einer einfachen Gastroenteritis bis hin zur Hämorrhagischen Colitis (HC) entwickeln. Postinfektiöse Komplikationen wie das Hämolytisch Urämische Syndrom (HUS) treten insbesondere bei Kindern auf. Das natürliche Habitat der Erreger ist die Darmflora von klinisch asymptomatischen Wild- und Nutzwiederkäuern. Durch die Aufnahme fäkal kontaminierter Lebensmittel kann eine Übertragung auf den Menschen erfolgen. Einige der *E. coli*-Serogruppen werden mit schweren Infektionsverläufen wie HC oder HUS in Verbindung gebracht. Zu den wichtigsten zählen dabei O26, O103, O111, O145 und O157. Im Jahr 2011 wurde bei einem EHEC-Ausbruch zuvor ungekannten Ausmaßes in Deutschland der bisher unauffällige Serotyp O104:H4 nachgewiesen. 47 Menschen erkrankten in Bayern im Rahmen des EHEC O104:H4-Ausbruchs.

Ziel dieser Studie am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim, war die Etablierung einer qualitativen Real Time-PCR zum Nachweis der *E. coli* O-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 als Singleplex- sowie als Pentaplex-PCR und der Vergleich der Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Selektivität. Nachweisgrenzen und Effizienzwerte der jeweiligen PCR-Systeme wurden anhand von Verdünnungsreihen (1 ng/µl bis 1 fg/µl) ermittelt, wobei die Messung der DNA-Konzentration photometrisch erfolgte. Die in der ISO/TS 13136:2012 als potenziell hochpathogen eingestufteten STEC-Stämme können somit anhand der dort beschriebenen Primer- und Sondensequenzen aus Probenisolaten detektiert werden.

Im Rahmen der EHEC-Krise 2011 wurde die molekularbiologische Diagnostik *stx2*-positiver Probenisolate auf den Nachweis des *E. coli*-Serotypen O104:H4 ausgedehnt. Die Untersuchungsdaten dieser und aller weiteren, *stx*-positiven Isolate des EHEC-Labors (LGL, Oberschleißheim) aus den Jahren 2009 bis 2011 (416 Isolate humanen Ursprungs, 31 aus Lebensmittel-, 16 aus Schlachtkörper-, 3 aus Wasser- und 52 aus Tierkotproben) sowie die Serotypisierungsergebnisse des RKI, Wernigerode, bzw. des BfR, Berlin, von 09/2004 bis 2011 wurden ausgewertet und beschrieben.

XIII.

Optimierung der Kolonieblot-Hybridisierung zum simultanen Nachweis von Shigatoxin 1 (stx1) und 2 (stx2) bei EHEC

Daniela Sebah, Julia Bollinger, Ulrich Busch, Ute Messelhäuser, Ingrid Huber

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

Obwohl die Kolonieblot-Hybridisierung (KBH) ein methodisch aufwendiges und zeitintensives Verfahren zur Isolierung von EHEC ist, gilt sie als Goldstandard zum Nachweis und zur Isolierung lebender Erreger in Verdachtsproben, da moderne auf real-time PCR basierende Verfahren die Unterscheidung von lebenden und toten Erregern nicht erlauben. Der Zeitaufwand von drei Arbeitstagen konnte mit der hier vorgestellten optimierten KBH-Methode durch eine Reduzierung der Hybridisierungszeit auf zwei Tage verkürzt werden. Ferner konnte durch den Einsatz von unterschiedlich markierten Sonden und entsprechenden Antikörpern zur Detektion der simultane Nachweis von zwei Pathogenitätsfaktoren (*stx1* und *stx2/stx2f*) in einem Blot gezeigt werden. Hierzu wurde die für *stx1* spezifische Sonde mit Biotin gelabelt und die für *stx2* spezifische hmit Digoxigenin. Im Anschluss erfolgte die Detektion mit einem anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper sowie mit einem anti-Biotin Meerrettich Peroxidase gekoppelten Antikörper. Unter Einsatz Enzym-spezifischer Substrate konnte somit eine *stx1* und *stx2* differenzierende Visualisierung mittels Enzym-Substrat Reaktion erfolgen.

Des Weiteren wurde der Nachweis von Shigatoxin 2 mittels KBH dahingehend optimiert, dass durch eine weitere Sonde auch der Subtyp *stx2f* mit detektiert wird.

XIV.

Untersuchungen zum Nachweis von HUSEC 41 (*E. coli* Serovar O104:H4) aus Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs

Felicitas Düker¹, Jorge A. Fernández-Silva¹, Melanie Hasse², Ingrid Huber³, Michael Bülte¹

¹ Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

² Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz

³ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

In Deutschland traten im Jahr 2011 4.321 Erkrankungen auf, die durch einen neuartigen *E. coli*-Stamm (enteroaggregativer hämorrhagischer *E. coli*, EAHEC; HUSEC 41) verursacht wurden. Es traten 852 HUS-Fälle auf, 50 Erkrankte starben [1]. Durch epidemiologische Untersuchungen konnte der Vektor des Ausbruchsgeschehens eingegrenzt werden, ein einschlägiger Nachweis des Erregers aus Lebensmitteln gelang bisher nicht. Dabei stellt sich die Frage, ob die eingesetzten Verfahren zum Nachweis von *E. coli* O104:H4 aus Lebensmitteln geeignet sind.

In eigenen Untersuchungen wurden je 6 Chargen Rinderhackfleisch, Rohmilch, unpasteurisierte Apfelsaft sowie Sprossen artifiziell mit dem 48 h-kältegestressten HUSEC 41-Stamm kontaminiert (ca. 1-2 KbE/ g). Die Anreicherung erfolgte in drei Nährmedien (mTSB+N, BRILA, BPW) über 6 h bei 37 °C. Anschließend wurde auf TBX- und ESBL-Agar subkultiviert; die Bestätigung verdächtiger Kolonien erfolgte mittels konventionellem [2] sowie Real-Time PCR-Verfahren [3]. Zusätzlich wurden als Screeningverfahren aus den Anreicherungsmedien ein Enzym-Immunoassay (EIA) sowie die Real-Time PCR [3] durchgeführt.

Alle Proben konnten mit mindestens einer Nachweiskaskade als positiv detektiert werden. Als Anreicherungsmedien können mTSB+N für Rinderhackfleisch sowie BRILA-Bouillon und BPW für Sprossen und unpasteurisierten Apfelsaft empfohlen werden. Die drei Nährmedien erwiesen sich auch für Rohmilch als geeignet. Der ESBL-Agar kann als Subkultivierungsmedium uneingeschränkt empfohlen werden; der Nachweis des Ausbruchsstammes ist innerhalb von zwei Tagen möglich. Die Erregerisolierung auf TBX-Agar erwies sich als deutlich schwieriger bzw. konnte nicht zuverlässig geführt werden (Sprossen). Das Screening mittels EIA oder Real-Time PCR ist aus der 6 h-Anreicherung, mit Ausnahme bei Sprossen, möglich.

Das Projekt wurde finanziert vom Ministerium der Justiz und für Verbraucherschutz des Bundeslandes Rheinland-Pfalz (Förderkennzeichen 57-86 81/2011-3#10, Referat 5712).

[1] Anonymous. EHEC/HUS O104:H4- der Ausbruch wird als beendet betrachtet. Pressemitteilung des Robert Koch-Instituts vom 26.07.2011.

[2] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 2011. 11:671-76.

[3] Huber I. Multiplex-real-time PCR zum Nachweis des EHEC-Stammes O104:H4 für Blockgeräte. Persönliche Mitteilung.

XV.

Überleben von STEC O26-Isolaten in Rohwurstprodukten

Rohtraud Pichner¹, Siegfried Münch¹, Jan Kabisch¹, Stefanie Müller-Herbst² und
Christina Böhnlein¹

¹ Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner Institut, Dienststellen: Kulmbach¹ und Kiel^{1*}

² ZIEL, Abteilung Mikrobiologie, TU München

Keywords: EHEC/STEC, NonO157, fermentierte Rohwurst, Tenazität

Shigatoxin produzierende *Escherichia coli*, die nicht dem Serotyp O157 angehören (non O157), sind in Deutschland inzwischen für die meisten der gemeldeten STEC bedingten Gastroenteritiden verantwortlich [1; 2]. Dabei wurden 752 der seit 2001 erfassten EHEC-Erkrankungsfälle durch den Serotyp O26 verursacht [2]. Dieser gehört in Deutschland zu den 6 am häufigsten aus Patienten isolierten Serotypen [1]. In Lebensmitteln wurde er bisher eher selten nachgewiesen [1], bei einem dänischen EHEC O26:H11-Ausbruch wurde über eine Fall-Kontroll-Studie als wahrscheinlichste Infektionsquelle ein fermentiertes Rohwurstprodukt identifiziert [3].

Derzeit existieren wenige Daten über die Tenazität von STEC O26-Stämmen in fermentierten Rohwurstprodukten. Auch liegen keine Studien vor, die dabei die Herkunft der O26-Isolate mit berücksichtigen.

Im Rahmen eines FEI-Forschungsvorhabens (AiF 16908N) wurden daher Rohwurstprodukte artifiziell mit einem Pool aus drei STEC O26:H11-Stämmen unterschiedlicher Herkunft (Patient, Kälberfaeces, Teewurst) inokuliert. Die Rohwürste wurden nach industriellen Standardrezepturen hergestellt, gereift und während der Reifung die rekultivierbaren STEC-Kolonien auf Grundlage unterschiedlicher Pathogenitätsfaktoren den Inokulationsstämmen zugeordnet.

In kurzgereiften, streichfähigen Rohwurstprodukten hatte nach 28 Tagen das Teewurstisolat mit über 50 % den größten Anteil an der rekultivierbaren STEC-Population, den geringsten Anteil (< 20 %) hatte das Isolat aus Kälberfaeces. Bei einem lang gereiften Rohwurstprodukt konnten kurz nach der Inokulation zum Teil nur noch vereinzelt STEC O26:H11 direkt nachgewiesen werden, ab dem ersten Reifungstag war eine Kultivierung nur noch nach Anreicherung in einigen Proben möglich.

Der Vortrag informiert über die ersten Ergebnisse des FEI-Projektes AiF 16908 N, das in Kooperation zwischen dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (MRI) und der Abteilung für Mikrobiologie (ZIEL, TU München) durchgeführt wird.

[1] Werber D, Beutin L, Pichner R, Stark K, Fruth A: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14: 1803-1806.

[2] Robert Koch Institut. *SurvStat* [zitiert am 28. Februar 2013]. Online verfügbar von <http://www3.rki.de/SurvStat>

[3] Ethelberg S, Smith B, Torpdahl M, Lisby M, Boel J, Jensen T, Molbak K: An outbreak of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. *Eurosurveillance* 2007; 12 (22): pii=3208. Online verfügbar: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3208>.

XVI.

Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese

S. Peng^{1,2}, W. Hoffmann³, W. Bockelmann⁴, J. Hummerjohann^{2*}, R. Stephan¹, and P. Hammer³

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

² Agroscope Liebefeld-Posieux, Bern, Switzerland

³ Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products, Max Rubner-Institut, Kiel, Germany

⁴ Department of Microbiology and Biotechnology, Max Rubner-Institut, Kiel, Germany

* J. Hummerjohann, Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 Bern, Switzerland

e-Mail: joerg.hummerjohann@alp.admin.ch

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, raw milk cheese, cheese production, spiking

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are foodborne pathogens able to cause gastrointestinal diseases, including watery or bloody diarrhea and hemorrhagic colitis. In a proportion of cases, the infection leads to severe complications, including the hemolyticuremic syndrome. Contaminated raw meat and raw meat products as well as raw milk and raw milk products are the main risk factors considered STEC vectors. In a Swiss study, STEC were detected in 5.7% of raw milk cheese samples collected at the producer level (Zweifel et al., 2010). Therefore, investigations on the survivability of STEC in raw milk cheese are important in view of food safety and may aid in the development of control strategies for STEC.

In the present study, the fate of 5 different *Escherichia coli* strains, including 3 STEC strains, was analyzed during the production and ripening of semihard raw milk cheese. The strains, which were previously isolated from raw milk cheese, were spiked into raw milk before cheese production at 2 different levels (approximately 10^1 and 10^3 cfu/mL, respectively). Two cheese types were produced, which differed in cooking temperatures (40 and 46°C). The cheeses were sampled during manufacture and the 16-wk ripening period. An increase in *E. coli* counts of approximately 3.5 log₁₀ cfu/g occurred from raw milk to fresh cheese at d 1, which was attributed to a concentration effect during cheese production and growth of the strains. During ripening over 16 wk, a slow, continuous decrease was observed for all strains. However, significant differences were found between the *E. coli* strains at the applied spiking levels, whereas the inactivation was similar in the 2 different cheese types. The 2 generic *E. coli* strains survived at higher counts than did the 3 STEC strains. Nevertheless, only 1 of the 3 STEC strains showed significantly weaker survival at both spiking levels and in both cheese types. Six of 16 cheeses made from raw milk at a low spiking level contained more than 10 cfu/g of STEC at the end of the 16-wk ripening process. After enrichment, STEC were detected in almost all cheeses at both spiking levels. Particularly because of the low infectious dose of highly pathogenic STEC, even low colony counts in raw milk cheese are a matter of concern.

XVII.

Validation and application of real-time PCR screening for the most pathogenic STEC groups in raw milk cheese

Jörg Hummerjohann & Javorka Naskova (joerg.hummerjohann@alp.admin.ch)

Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern

Keywords: real-time PCR, Rohmilchkäse, STEC, ISO/TS 13136:2012

STEC is a diverse group of *E. coli* serotypes carrying the shigatoxin-encoding *stx*-genes. The International Standardization Organization has developed a method for detection of STEC in food (ISO/TS 13136:2012). Samples are screened by real-time PCR for *stx*, *eaeA* and for the presence of the "most dangerous five" serogroups O157, O111, O26, O103 and O145.

Our aim was to verify the performance characteristics of the assays in our lab, generate data on the detection limit of STEC in artificially contaminated raw milk cheese, and to apply the method on raw milk cheese samples. In addition to the ISO protocol, assays for the presence of STEC O91, STEC O121 and the ESBL-positive O104:H4 serotype, which has been recently caused a large outbreak in Germany, were used.

In our hands, the reaction efficiencies of real-time PCRs were similar to the previously reported ones. Two strains, *E. coli* NCTC 12900 (*stx*-, *eaeA*+, O157) and *E. coli* CVUAS 2960 (*stx*2+, O136:H16), could both be detected in 4 different raw milk cheese matrices artificially contaminated with 10 cfu/25g. However, one cheese matrix seemed to have an inhibitory effect on the growth of both strains. We applied the assays on 224 raw milk cheese samples. 14 samples (6.3%) were *stx*-positive. 13 (5.8%) were *eaeA*-positive. No samples contained positive signals for O111. For O157, O26, O145, O103, O111, O91, O121 and O104 0.9%, 1.8%, 10.7%, 1.8%, 0%, 0.5%, 0.9% and 0.5% were PCR-positive, respectively. 8 samples (3.6%) were *stx*- and *eaeA*-positive, and 6 (2.7%) contained signals for *stx* & *eaeA* & O157/O26/O145/O103/O111/O121. One sample was real-time PCR positive for *stx* & O91 and none for *stx* & O104. One STEC O26 and one STEC O91 could be isolated among the most pathogenic serogroups. Furthermore, no ESBL-positive strains could be isolated from the enrichments.

In conclusion, STEC real-time PCR assays were successfully introduced in the lab. The observed cheese matrix effect on growth inhibition of STEC in enrichment broth may lead to weak positive or even false positive samples. The prevalence of STEC belonging to the most dangerous serogroups in raw milk cheese is low.

XVIII.

Crossing Borders and Crossing Disciplines: Expertenworkshop und Krisenseminar zum Ausbruch eines zoonotischen Infektionserregers in der deutsch-niederländischen Grenzregion

Ricarda Schmithausen²; Jan Müller³; Sophia Schulze-Geisthövel²; Tilman Wilke²; Verena Raab²; Oliver Breuer¹; Brigitte Petersen^{1,2}; Alexander Friedrich³

¹ GIQS e.V. (Bonn, Deutschland)

² Universität Bonn, Abteilung Präventives Gesundheitsmanagement (Deutschland)

³ University Medical Centre Groningen (Niederlande)

Keywords: Krisenmanagement, Zoonosen, Euregio, Ausbruchmanagement, Multiresistenz

Im Fall des Ausbruchs eines antibiotikaresistenten, zoonotischen Infektionserregers in einer Grenzregion wären Entscheidungsträger verschiedener Disziplinen auf beiden Seiten der Grenze gefordert. Im Ausbruchfall müssen Informationen gesammelt, ausgewertet, weitergeleitet und auf deren Grundlage Entscheidungen für das Krisenmanagement getroffen werden. Aus den Erfahrungen des grenzüberschreitenden Forschungsprojektes SafeGuard (2009-2013) und des EHEC-Geschehens 2011 erwuchs bei Fachleuten und zuständigen Behörden in der Grenzregion die Gewissheit, dass nur mit einer gemeinschaftlichen, abgestimmten und eingespielten Vorbereitung ein solches Ausbruchsgeschehen zu bewältigen ist. Zu diesem Zweck findet im März 2013 ein Expertenworkshop in Groningen und im April 2013 ein darauf basierendes Krisenseminar in Bonn statt. An dem Expertenworkshop nehmen Fachleute aus der Veterinärverwaltung und den Gesundheitsämtern im Grenzgebiet, sowie Wissenschaftler aus den Bereichen Tierwissenschaften, Humanmedizin, Mikrobiologie, ... teil und erarbeiten einen Entwurf eines Ausbruchsszenarios sowie Ziele und Methoden für das spätere Krisenseminar in Bonn.

Ziele der Veranstaltung sind:

1. Wissensträger aus Deutschland und den Niederlanden zusammen zu bringen, dauerhaft zu vernetzen (zu Themen wie Risikobewertung und Epidemiologie, Diagnoseverfahren und Ressourcen, Zuständigkeiten und Verwaltungsstrukturen).
2. Das Wissen vermitteln, welche Entscheidungsträger (in Behörden, Ministerien, Kliniken und Unternehmen, Interessensverbänden) in den Niederlanden und Deutschland alarmiert und involviert werden müssen.
3. Die Definition von Prozessen zur Gewinnung von Informationen über Schadenslagen bei einem grenzübergreifenden Geschehen.
4. Identifizierung, Definition und Optimierung der Aufgaben von „Schnittstellenmanagern“ innerhalb eines Handlungsstranges über Disziplinen und Grenzen hinaus.
5. Erarbeitung von Vorschlägen zur langfristigen Verbesserung der Zusammenarbeit an den Schnittstellen zwischen Politik, Verwaltung, Wissensträgern, Wirtschaft und der Öffentlichkeit.



Auf diese Weise soll ein Beitrag zum Erfahrungsaustausch und Zusammenwachsen von Verantwortlichen in der Krisenbewältigung in den Niederlanden, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen geleistet werden.

XIX.

Vergleich von STEC-Isolaten aus Lebensmitteln mit humanen HUSEC-Stämmen

Elisabeth Hauser¹, Alexander Mellmann², Torsten Semmler³, Helen Stoeber¹, Lothar H. Wieler³, Helge Karch², Nikole Kuebler¹, Angelika Fruth⁴, Dag Harmsen⁵, Thomas Weniger⁵, Erhard Tietze⁴, Herbert Schmidt¹

¹Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Garbenstr. 28, Universität Hohenheim, 70599 Stuttgart, ²Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, ³Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, ⁴Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, ⁵Poliklinik für Parodontologie, Universitätsklinikum Münster

Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) sind wichtige zoonotische Krankheitserreger des Menschen. Sie kommen im Gastrointestinaltrakt verschiedener Tiere vor und werden häufig über tierische und pflanzliche Lebensmittel auf den Menschen übertragen [1]. Im Rahmen dieser Studie wurden Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC)-Isolate, die aus Risikolebensmitteln isoliert wurden, mit molekularen und phylogenetischen Methoden untersucht. Damit sollte zusätzlich zur Virulenzgenausstattung das genetische Rückgrat der Stämme mit einbezogen werden, um ihr pathogenes Potential detaillierter zu beschreiben. Außerdem wurde die Antibiotikaresistenz der Stämme mit phänotypischen Methoden ermittelt [2]. Nach Durchführung einer Multilokus Sequenztypisierung (MLST) wurden die ermittelten Sequenztypen (ST) sowie Sequenztypkomplexe (STC) mit den hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)-assoziierten enterohämorrhagischen *E. coli* (HUSEC) Stämmen verglichen. Neben der Zuordnung zu verschiedenen ST und STC konnten in diesem Stammkollektiv drei größere Cluster nachgewiesen werden, die Gruppen unterschiedlicher Pathogenität abbilden. Darüber hinaus konnten zwei Stämme charakterisiert werden, die als multiresistent bezeichnet werden können. Die weitere Analyse zeigte außerdem genetisch verwandte Gruppen von lebensmittelassoziierten STEC und HUSEC, die denselben ST aufwiesen. Auf Grund ihrer zum Teil sehr ähnlichen Virulenzgenausstattung, der Besetzung von Integrationsstellen mit Fremd-DNA und der phylogenetischen Verwandtschaft mit den HUSEC-Stämmen, wurden STEC-Lebensmittelisolate gefunden, die auf eine erhöhte Pathogenität hinweisen. Diese Stämme sollen in weiteren Projekten genauer untersucht werden.

García A, Fox JG, Besser TE. Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A One Health perspective. ILAR J 2010; 51: 221-32.

Hauser E, Mellmann A, Semmler T, Stoeber H, Wieler LH, Karch H, Kuebler N, Fruth A, Harmsen D, Weniger T, Tietze E, and Schmidt H. Phylogenetic and molecular analysis of food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2013; doi:AEM.03552-12 [pii];10.1128/AEM.03552-12 [doi].

XX.

Überleben von *Escherichia coli* O104:H4 und O157:H7 in Oberflächenwasser

Annett Martin¹, Katharina Juraschek², Lothar Beutin²,

¹ Epidemiologie, Biometrie und mathematische Modellierung

² Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* (NRL-E.coli), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Max-Dohrn-Straße 8–10, 10589 Berlin, Germany

Über die Widerstandsfähigkeit des enteroaggregativen Shiga Toxin bildenden *E. coli* (EAEC-STEC) O104:H4-Ausbruchsstamms in der Umwelt ist bisher nur sehr wenig bekannt. Im Gegensatz zu anderen EHEC besitzt EAEC-STEC O104:H4 kein bekanntes tierisches Reservoir. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Erreger längere Zeit in der Umwelt, z.B. in Wasser, überleben kann. Da es sich bei EAEC-STEC O104:H4 um einen neuen, sehr pathogenen Erreger handelt, sollte er hinsichtlich seiner Überlebensfähigkeit in Wasser näher charakterisiert werden [1].

Während des EAEC-STEC O104-Ausbruchs 2011 konnten mit real-time PCR Verfahren genetische Spuren des O104 Erregers in Wasserproben aus Frankfurt/Main und Minden nachgewiesen werden. Allerdings ließ sich der EAEC-STEC O104 Stamm aus keiner der inkriminierten Wasserproben isolieren. Da sich der PCR-Nachweis als sehr spezifisch erwiesen hat, muss damit gerechnet werden, dass der Erreger in geringen Mengen im Oberflächenwasser persistiert und möglicherweise auch in schwer kultivierbaren Zuständen vorliegt.

In unserem Forschungsvorhaben wurden Vorversuche zum Überleben von EAEC-STEC O104 und STEC O157 in Wasserproben und in gepuffter Salzlösung (PBS, pH 7,2) vorgenommen. *E. coli* O157 diente dabei als Goldstandard, da schon bekannt ist, dass dieser Keim in der Umwelt überleben kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Serotypen im Wasser bei 4-6°C für einige Wochen überleben können.

Durch statistische Analysen sollte herausgefunden werden, ob sich die mittleren Überlebenszeiten der Bakterien in Oberflächenwasser und PBS signifikant unterscheiden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob die Überlebensfähigkeit von der Konzentration der eingebrachten Bakterien abhängig ist. Außerdem sollten mögliche Unterschiede in der mittleren Überlebenszeit zwischen *E. coli* O157 und O104 in Seewasser statistisch analysiert werden.

Als statistisches Verfahren wird die Überlebenszeitanalyse nach der Kaplan-Meier Methode angewendet.

Nach bisherigen Erkenntnissen zum Überleben von *E. coli* in der Umwelt ist davon auszugehen, dass O104 im Wasser über längere Zeiträume persistieren kann und somit die Möglichkeit einer Ansteckung von Menschen durch direkte oder indirekte Übertragung dieser Keime aus der Umwelt theoretisch besteht.

[1] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Bedeutung von EHEC O104:H4 in Bockshornkleesamen, die zu anderen Lebensmitteln als Sprossen und Keimlingen weiterverarbeitet werden. Aktualisierte Stellungnahme Nr. 031/2011 des BfR vom 26. Juli 2011.

XXI.

Shiga toxin subtypes associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from hunted red deer, roe deer, chamois and ibex in Switzerland

*Eveline Hofer, Nicole Cernela, and Roger Stephan**

Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Winterthurerstr. 272, 8057 Zurich, Switzerland

** R. Stephan, Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zurich, Switzerland, Phone 0041-44-6358651, Fax 0041-44-6358908, E-mail stephanr@fsafety.uzh.ch*

Keywords: STEC, wild ruminants, shiga toxin-subtypes, intimin, EHEC-enterohemolysin

STEC have been isolated from faeces of a variety of healthy domestic and wild animals but domestic ruminants, especially cattle, are regarded as principal reservoir of STEC for human infection. Nevertheless, wild ruminants may be a potential reservoir and therefore a source for human infections, and deer meat has been implicated in the transmission of STEC to humans. So far minimal characterization data are available for STEC strains from wild ruminants and also about *stx* subtypes and virulence factors of non-O157 STEC strains from wild ruminants. Such data, however, are necessary to gain insight into the relationship of these strains and strains isolated from patients. In this study we characterized strains isolated from red deer, roe deer, chamois and ibex by (i) subtyping the *stx* genes, (ii) examining strains for the top nine serogroups (O26, O45, O91, O103, O111, O113, O121, O145, O157), and (iii) testing strains for the presence of *eae* and *ehxA* genes. A total of 52 STEC strains, isolated from fecal samples of six ibex, 12 chamois, 15 roe deer, and 19 red deer were further characterized. Eleven of the 52 strains belonged to one of the top nine STEC serogroups. Eight STEC strains were of serogroup O145, two strains of serogroup O113 and one strain of serogroup O157. None of the strains harbored *stx2a*, *stx2e*, or *stx2f*. *Stx2b* (24 strains) and *stx1c* (21 strains) were the most frequently detected *stx* subtypes, occurring alone or in combination with another *stx* subtype. Eight strains harbored *stx2g*, five strains *stx2d*, three strains *stx1a*, two strains *stx2c* and one strain *stx1d*. *Stx2g* and *stx1d* were detected in strains not harboring any other *stx* subtype. The *eae* and *ehxA* genes were detected in two and 24 STEC strains, respectively. Considering both, the serogroups and the virulence factors, the majority of the STEC strains isolated from red deer, roe deer, chamois and ibex do not show the typical patterns of highly pathogenic STEC strains. To assess the potential pathogenicity of STEC for humans, strain isolation and characterization are therefore of central importance.

XXII.

Klonale Verwandtschaft enteroaggregativer *E. coli* in Sachsen

Susanne Hauswaldt^{1*}, Christoph Dracopoulos¹, Ulrich Lindner¹, Arne Rodloff², Werner Solbach¹, Johannes Knobloch¹

¹ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

² Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Universität Leipzig

* S. Hauswaldt, UKSH, Campus Lübeck, IMMh, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck

Keywords: EAEC, MLST, Rep-PCR

Einleitung Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) sind sowohl für sporadische Diarrhoe bei Kindern und Erwachsenen als auch für lebensmittelassoziierte Ausbrüche verantwortlich. Sie werden durch ihre aggregative Adhärenz an Epithelzellen definiert. Typische EAEC (t-EAEC) tragen ein Plasmid (pAA) mit dem Transkriptionsaktivator AggR. Atypischen EAEC (a-EAEC) fehlt dieses Plasmid. Für Deutschland existieren keine aussagekräftigen Daten zur Epidemiologie von EAEC.

Methoden In unserer Studie wurden 151 von Patienten aus Sachsen isolierte *E. coli* Stämme aus den Jahren 2004 bis 2006 mit Hilfe eines Zellkulturassays auf das Vorhandensein der aggregativen Adhärenz von EAEC gescreent. Mittels PCR wurden alle EAEC auf den chromosomalen Marker *pic* sowie die auf dem pAA Plasmid lokalisierten Gene *aggR*, *aat* und *astA* getestet. Eine Genotypisierung erfolgte mit *multi locus sequence typing* (MLST). Parallel dazu wurde eine Rep-PCR (DiversiLab) zur weiteren Analyse der klonalen Verwandtschaft durchgeführt.

Ergebnisse 68 Stämme konnten anhand ihrer aggregativen Adhärenz als EAEC identifiziert werden. 18 (27%) wurden als t-EAEC klassifiziert. Bei 13 von 18 t-EAEC wurden neben *aggR* auch alle anderen oben genannten Gene nachgewiesen. Jedoch wurden nur einzelne a-EAEC positiv auf *pic* (n=3) oder *astA* (n=7) getestet. MLST ergab 32 unterschiedliche Sequenztypen (ST), die sich auf 5 klonale Komplexe und 20 Singletons verteilten. Während 16 von 18 t-EAEC zu den vorherrschenden klonalen Komplexen CC10 und CC40 gehörten, zeigten a-EAEC eine deutlich größere Diversität. Die insgesamt 50 Stämme verteilten sich auf 28 STs, davon 19 Singletons. Der größte klonale Komplex (CC10) enthielt 14 Stämme, erwies sich jedoch in der Rep-PCR als divers. Zu diesem Komplex gehörten sowohl t-EAEC als auch a-EAEC Stämme. CC40 (n = 13) gehörten die Sequenztypen ST40 und ST200 an, die beide nur t-EAEC enthielten. Beide Sequenztypen konnten mittels Rep-PCR klar voneinander differenziert werden und waren in sich homogen.

Zusammenfassung In Sachsen sind t-EAEC mit wenigen klonalen Linien vertreten. Die Sequenztypen ST40 und ST200 sind in sich homogen. Der Sequenztyp ST10 weist eine hohe Diversität hinsichtlich Virulenzfaktoren und Rep-PCR auf. A-EAEC zeigen im Vergleich zu t-EAEC eine höhere Diversität.

XXIII.

Case of urinary tract infection and sepsis caused by enteroaggregative *Escherichia coli* after diarrhea

Kathrin Herzog¹, Judith Engeler Duse², Markus Hugentobler², Roger Stephan³, Magdalena Nüesch-Inderbinnen³ and Herbert Hächler³

¹ Institute of Laboratory Medicine, Kantonsspital Frauenfeld, CH-8501 Frauenfeld, Switzerland

² Departement of Nephrology and Internal Medicine, Kantonsspital Frauenfeld, CH-8501 Frauenfeld, Switzerland,

³ Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland

Keywords: enteroaggregative *E. coli*, urinary tract infection, sepsis, immuno-supression

A 55-year-old female patient, 7 years after kidney transplantation, presented herself to the emergency unit with anuric kidney failure as well as persistent diarrhea and vomiting since fifteen days. She was hemodynamically stable, but hypotonic, dehydrated, and anuric so that continous venovenous hemodialysis and filtration (CVVHDF) was started. Despite the anuric kidney failure a low serum potassium of 2.7mmol/l (10.5mg/dl) was found, consistent with the severe and longstanding gastroenteritis. Substitution of liquids and electrolytes was initiated, and dialysis was stopped when diuresis resumed. By gastroscopy and colonoscopy, erosive gastritis and unspecific inflammation in the colon were detected. Biopsies revealed eosinophilic ileitis and colitis, but no pathogen. Standard bacteriology of three stool samples was negative for *Salmonella*, *Shigella*, and *Campylobacter*, as well as for mycobacteria, and so was the enzyme-linked immunosorbent assay used for detecting *C. difficile* toxins A/B. The parasitological analysis revealed *Blastocystis hominis*. Consequently, antibiotic therapy with metronidazole was started. Further stool samples were analysed for EPEC, EAEC, STEC, EIEC, and ETEC. They tested positive for EPEC and two distinct strains of EAEC.

One EAEC strain later caused complicating urinary tract infection and sepsis (proven by PFGE typing). This is the first report of extra-intestinal invasive infection caused by EAEC.

XXIV.

Prüfung einer rekombinanten Stx2e-Toxoidvaccine in Feldversuchen am Zieltier Schwein

Olaf Bastert¹, Regine Fricke¹, Olaf Lüder¹, Rolf Bauerfeind², Hans-Joachim Selbitz¹

¹ IDT Biologika GmbH, Geschäftsbereich Tiergesundheit, F & E, Dessau-Roßlau; olaf.bastert@idt-biologika.de

² Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen

Keywords: Impfstoff, Schwein, Ödemkrankheit, *Escherichia coli*, Stx2e

Einleitung: Die Ödemkrankheit (ED, Edema Disease) ist eine weltweit verbreitete, häufig letal verlaufende Infektionskrankheit junger Schweine. Sie wird durch tierartsspezifische *E. coli* (EDEC)-Stämme verursacht, die durch die Bildung von adhäsiven F18-Fimbrien und krankheitsauslösendem Shigatoxin Stx2e gekennzeichnet sind. Zur Immunprophylaxe wurde ein Toxoidimpfstoff auf Basis einer rekombinanten Stx2e-Variante entwickelt, deren zytotoxische Aktivität mittels zielgerichteter Mutagenese um mehr als den Faktor 10⁴ reduziert worden war. In Feldversuchen sollte die Wirksamkeit und Verträglichkeit des neuen Handelsimpfstoffes ECOPORC SHIGA bestimmt werden.

Methoden: In deutschen ferkelerzeugenden Betrieben wurden drei Feldversuche durchgeführt. Saugferkel (n = 399, 327 bzw. 309) wurden zufällig jeweils zwei Versuchsgruppen zugeteilt und am vierten Lebenstag (Studientag0) verblindet entweder mit dem Impfstoff (IVP, ECOPORC SHIGA) oder mit dem Kontrollprodukt (CP, physiologische Kochsalzlösung) geimpft. Alle Ferkel wurden an den Studientagen 0, 14 und 42 (28 und 49) gewogen und in den Zeiträumen Studientage 0 – 14 und 24 – 42 (31 – 49) klinisch untersucht. Ausbrüche von Ödemkrankheit wurden durch pathologische, histopathologische und bakteriologische Untersuchungen verifiziert und ihr Schweregrad anhand eines Scoring-Schemas klassifiziert. Jedes Ferkel wurde am Studientag 21 und 49 (56) blutserologisch auf Stx2e-neutralisierende Antikörper untersucht. Studientage in Klammern beziehen sich auf Versuch 2.

Ergebnisse: Der Vergleich der geprüften Verträglichkeitsparameter (Verhalten, Atmung, Verdauung, Haut, Körpertemperatur und lokale Reaktionen) zeigte signifikant die Äquivalenz der Impf- und Kontrollgruppe. Der Anteil der Ferkel mit Stx2e-neutralisierenden Antikörpern war in der IVP-Gruppe jeweils größer als in der CP-Gruppe (Studientag 21: IVP 77% zu CP 0%*; 85% zu 6%*; 77% zu 0%*; Studientag 49 [56]: 87% zu 0%*; 100% zu 4%*; 100% zu 6%*). In den Versuchen 2 und 3 trat Ödemkrankheit auf. Hier waren in den IVP-Gruppen die Morbidität (0% zu 15%*; 1% zu 6%[#]) sowie die Mortalität (0% zu 11%*; 0% zu 3%) geringer und die durchschnittliche Gewichtszunahme im Flatdeck (6.889g zu 6.197g*; 5.272g zu 4.716g*) größer als bei den CP-Gruppen [*p-Wert < 0,001; [#] p-Wert = 0,0335].

Schlussfolgerung: Der neu entwickelte Stx2e-Toxoidimpfstoff war gut verträglich und erzeugte einen belastbaren Impfschutz. Er erfüllt damit alle entsprechenden Anforderungen der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA). ECOPORC SHIGA ist demnach zur immunologischen Prophylaxe der durch EDEC hervorgerufenen Ödemkrankheit der Schweine auch unter Praxisbedingungen gut geeignet.

XXV.

Vorkommen und Virulenz-Charakterisierung von *E. coli* EHEC/EAEC Hybrid-Pathovaren in Deutschland 2008-2011

Rita Prager, Angelika Fruth, Erhard Tietze, Kerstin Fiege, Patrick Rast, and Antje Flieger

National Reference Centre for Salmonella and other Enteric Bacterial Pathogens, Division of Bacterial Infections,

Robert Koch-Institut, Burgstr. 37, D-38855 Wernigerode, Germany

Technical University Braunschweig, Faculty of Life Sciences, Institute of Microbiology, Spielmannstr. 7, 38106

Braunschweig, Germany

E. coli bacteria on the one hand belong to the normal flora of the human intestine but on the other hand may cause disease. Pathogenic *E. coli* variants harbor specific genes encoding virulence determinants. For example, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) are an intestinal *E. coli* pathovar carrying the shiga toxin gene (*stx*) and in most cases further important loci, such as the pathogenicity island LEE (locus of enterocyte effacement) and the enterohemolysin gene (*ehxA*). Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) typically possess pAA virulence plasmids encoding different AAF fimbriae responsible for unique autoaggregation and adhesion properties but no *stx*. Differentiation of intestinal pathogenic *E. coli* is further achieved via serotyping of O- and H-surface markers. *Stx*-positive strains inducing the severe syndrome HUS, in most cases belong to the serovars O157:H7/H⁺. However, the huge 2011 HUS/bloody diarrhea outbreak in Germany was caused by the rare EHEC serovar O104:H4. Remarkably, the outbreak strain harbored both EHEC (*stx*) and EAEC (pAA) markers. To evaluate the importance of such EHEC/EAEC hybrid strains in human disease, we here analyzed the 2008-2011 strain collection of the NRC for *Salmonella* and other Enteric Bacterial Pathogens. From 1891 precharacterized *E. coli* collection strains (excluding O104:H4 strains), 162 were chosen for pAA plasmid analysis. Here we found only one novel EHEC/EAEC hybrid strain which was additionally characterized by determination of: serovar, *stx* gene subtype, AAF fimbrial type, plasmid profile, and antibiotic resistance profile.

XXVI.

Instabilität des pAA-Virulenzplasmids im *Escherichia coli* O104:H4-Ausbruchsstamm 2011

Lisa Kunsmann¹, Wenlan Zhang¹, Martina Bielaszewska¹, Alexander Mellmann^{1,2}, Andreas Bauwens¹, Robin Köck¹, Annelene Kossow¹, Helge Karch^{1,2}

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, D-48149 Münster

² Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Universität Münster, D-48149 Münster

e-Mail: Lisamaria.Kunsmann@ukmuenster.de

Keywords: *Escherichia coli* O104:H4; pAA Plasmid Verlust; aggregative Adhärenz; Virulenz; hämolytisch-urämisches Syndrom

Der *Escherichia coli* O104:H4-Stamm, der den größten HUS-Ausbruch in der Nachkriegszeit in Deutschland verursachte, ist ein hochvirulenter Hybrid aus EHEC und enteroaggregativen *E. coli* (EAEC). Charakteristisch für den Ausbruchsstamm ist seine sogenannte aggregative Adhärenz an menschliche intestinale Epithelzellen, hervorgerufen durch Adhärenzfimbrien des Typ I (AAF/I), die auf dem pAA- Virulenzplasmid kodiert sind. Die verstärkte intestinale Adhärenz fördert möglicherweise die Verweilzeit im Darm und damit einen effizienteren Transfer von Shiga Toxin 2a in den Blutkreislauf. Dies könnte die hohe Pathogenität von *E. coli* O104:H4 erklären. Da die Stabilität des pAA-Virulenzplasmids unbekannt ist, wurden Untersuchungen an 170 Patientenisolaten (128 HUS-Patienten, 42 Diarrhö-Patienten) auf das Vorhandensein von pAA durchgeführt. Die Quantifizierung der pAA-tragenden Bakterien erfolgte mittels Kolonien-Blot-Hybridisierung. Bei 12 Isolaten (7,1 %) konnte kein Plasmid nachgewiesen werden, obwohl von 7 dieser Patienten aus früheren Stuhlproben pAA-positive Stämme isoliert wurden.

Die Quantifizierung des Anteils von pAA-positiven gegenüber pAA-negativen Kolonien im Verlauf der Infektion zeigte, dass bei EHEC O104:H4 ein rascher pAA Plasmidverlust im Gastrointestinaltrakt des Wirts auftrat. Die pAA-negativen Stämme verlieren zum größten Teil ihre Adhäsionsfähigkeit an intestinale Epithelzellen (HCT-8) und zeigen nicht mehr den typischen aggregativen Phänotyp. Zudem haben sie eine geringere Fähigkeit, ein HUS zu verursachen ($p = 0,001$). Somit mindert der Verlust des pAA-Plasmids die Virulenz des Ausbruchsstammes.

XXVII.

Sensitivitätsunterschiede von mikro- und makrovaskulären Endothelzelllinien auf Shiga Toxin 1 und Shiga Toxin 2

Andreas Bauwens, Martina Bielaszewska, Johannes Müthing und Helge Karch

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

e-Mail: Andreas.Bauwens@ukmuenster.de

Keywords: Shiga Toxine, Endothelzellen, HUS

EHEC verursachen nicht-blutige und blutige Diarrhö sowie das lebensbedrohliche hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), welches aus der mikrovaskulären Endothelzellschädigung in Nieren, Gehirn und anderen Organen resultiert. Die Hauptvirulenzfaktoren der EHEC sind Shiga Toxine (Stx), die in 2 Haupttypen unterteilt werden: Stx1 und Stx2, welche 53 % bzw. 64 % Sequenzidentität in ihrer A- bzw. B-Untereinheit aufweisen. Nach Translokation vom Gastrointestinaltrakt in den Blutkreislauf gelangen diese zu ihrem Wirkungsort, den kapillaren Endothelzellen, wo sie Rezeptorvermittelt endozytiert und retrograd prozessiert werden. Das A1-Fragment wirkt im Zytosol Proteinbiosynthese-inhibierend, was final zum Zelltod führt. Weitere beschriebene Effekte von Stx sind die Depurinierung von chromosomaler DNA, die Umorganisation des Zytoskeletts und die Induktion von Apoptose. In dieser Studie wurden unterschiedliche zytotoxische Effekte von Stx1a und Stx2a auf humane mikrovaskuläre Gehirnendothelzellen (*human brain microvascular endothelial cells*, HBMEC) und EA.hy 926 Zellen makrovaskulären Ursprungs bestimmt. Mit Hilfe von Proteinbiosynthese-, Zellproliferations- und Zytotoxizitäts-Assays konnten konzentrationsabhängig verschiedene Sensitivitäten der beiden Zelllinien bestimmt werden. Gegenüber Stx1a weisen die mikro- und makrovaskulären Endothelzellen eine ähnliche Sensitivität auf, unterscheiden sich jedoch gegenüber Stx2a etwa um den Faktor 10^3 . Beide Toxin-Prototypen verursachen in den mikrovaskulären Zellen bei insgesamt niedrigeren Konzentrationen im Vergleich verstärkte apoptotische Reaktionen. Da die Proteinbiosyntheseleistung beider Zelllinien selbst bei hohen Toxindosen nur auf ~50 % absinkt, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Assoziation von Stx2a-produzierenden Stämmen mit schweren klinischen Verläufen auf zellulärer Ebene nicht ausschließlich auf Rezeptordichten und Proteinbiosyntheseinhibition zurückgeführt werden kann, sondern andere, bislang unbekannte Zelltyp-spezifische Faktoren eine Rolle spielen.

XXVIII.

Antitumor-Aktivität von Shiga Toxin gegenüber Gb3Cer/CD77-exprimierenden humanen Karzinomzelllinien des Pankreas

Wiebke Storck¹, Gottfried Pohlentz¹, Iris Meisen¹, Ivan U. Kouzel¹, Jörg Haier², Michael Mormann¹, Martina Bielaszewska¹, Helge Karch¹ und Johannes Müthing¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

² Zentrum für Krebsmedizin, Universitätsklinikum Münster, Waldeyerstraße 1, D-48149 Münster
e-Mail: pohlentz@uni-muenster.de

Keywords: Shiga Toxin, Glykosphingolipide, Massenspektrometrie, Tumore

Shiga Toxine (Stx) bestehen aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und fünf identischen B-Untereinheiten, was sie als AB₅-Toxine charakterisiert. Die B-Untereinheiten von Stx1a und Stx2a binden an die Glykosphingolipide (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer), worauf Stx-verursachte Schädigungen mikro- und makrovaskulärer humaner Endothelzellen zurückzuführen sind [1]. Die Identifizierung von Gb3Cer als ein Tumor-assoziiertes GSL in humanen Pankreaskarzinomen [2] veranlasste uns, die Expression von Gb3Cer und Gb4Cer in von primären Pankreastumoren abgeleiteten Zelllinien zu untersuchen und deren Sensitivität gegenüber Stx2a zu ermitteln [3].

Mittels Dünnschichtchromatographie in Kombination mit einem immunologischen (ELISA-ähnlichen) Verfahren und Massenspektrometrie konnten wir die Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer identifizieren. Als dominante Lipoformen traten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies mit C16:0-, C24:0- und C24:1-Fettsäuren auf. Die Zytotoxizitätsstudien ergaben eine moderate bis hohe Sensitivität der Zelllinien gegenüber Stx2a mit CD₅₀-Werten (halbmaximale Zytotoxizität) zwischen 10 pg/ml und 6 µg/ml. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Sensibilität gegenüber Stx2a nachgewiesen werden. Somit bedingt ein hoher Stx-Rezeptorgehalt nicht zwangsläufig eine hohe Stx2a-vermittelte Zellschädigung. Da in den vergangenen Jahren keine Verbesserungen hinsichtlich der Therapie von Pankreaskarzinomen erzielt wurden, sollte der Einsatz von Stx- oder Stx-Derivaten durchaus in Erwägung gezogen werden, auch wenn eine mögliche Schädigung des humanen Endothels einem Therapieansatz zunächst entgegensteht.

[1] Bauwens A, Bielaszewska M, Kemper B, Langehanenberg P, von Bally G, Reichelt R, Mulac D, Humpf HU, Friedrich AW, Kim KS, Karch H, Müthing J. Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 2010; 105: 515-528.

[2] Distler U, Souady J, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Friedrich AW, Karch H, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinić J, Müthing J. Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PLoS ONE* 2009; 4: e6813.

[3] Storck W, Meisen I, Gianmoena K, Pläger I, Kouzel IU, Bielaszewska M, Haier J, Mormann M, Humpf HU, Karch H, Müthing J. Shiga toxin glycosphingolipid receptor expression and toxin susceptibility of human pancreatic ductal adenocarcinomas of differing origin and differentiation. *Biol Chem* 2012; 393: 785-799.

XXIX.

Interaktion von Shiga Toxin 2e mit Glykosphingolipid-Rezeptoren porciner Endothelzellen: Modell für die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke

Iris Meisen¹, Regina Rosenbrück¹, Hans-Joachim Galla², Sabine Hüwel², Ivan U. Kouzel¹, Michael Mormann¹, Helge Karch¹ und Johannes Müthing¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

² Institut für Biochemie, Universität Münster, Wilhelm-Klemm-Straße 2, D-48149 Münster

e-Mail: meisen@uni-muenster.de

Keywords: STEC, Ödemkrankung des Schweins, Massenspektrometrie

Shiga Toxin 2e (Stx2e) ist der Hauptvirulenzfaktor, der für die Ödemkrankheit bei Ferkeln verantwortlich ist. Um den molekularen Mechanismus der durch Stx2e verursachten Hirnschädigung besser zu verstehen, wurde von uns die Interaktion von Stx2e mit primären Hirnendothelzellen des Schweins (*porcine brain capillary endothelial cells*, PBCECs) untersucht. Mit Hilfe eines immunchemischen Nachweisverfahrens in Kombination mit der Massenspektrometrie wurden die Glykosphingolipide (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer) als die relevanten Stx2e-Rezeptoren identifiziert [1]. Diese traten bei den PBCECs in unterschiedlichen Lipoformen mit einem hohen Anteil an hydroxylierten Fettsäuren im Ceramid auf, was bislang für mikrovaskuläre Endothelzellen des menschlichen Gehirns nicht beobachtet werden konnte. Gb3Cer und Gb4Cer der PBCECs lokalisieren in Lipid Rafts (Mikrodomänen), was durch Untersuchungen mit Detergenz-resistenten Membranen gezeigt werden konnte. Zytotoxische Effekte Stx2e-haltiger Kulturüberstände wurden in einem *in vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen. Diese Arbeiten belegen die Beteiligung von Stx2e an den cerebral-endothelialen und den für die Ödemkrankheit charakteristischen neurologischen Schäden. Die durch Stx2e-verursachten schweren porzinen Hirnschädigungen scheinen grundsätzlich verschieden zu den milder verlaufenden neurologischen Komplikationen zu sein, die bei Patienten beobachtet wurden, die sich 2011 mit dem Stx2a-produzierenden EHEC-Stamm O104:H4 infizierten [2, 3].

[1] Meisen I, Rosenbrück R, Galla HJ, Hüwel S, Kouzel IU, Mormann M, Karch H, Müthing J. Expression of Shiga toxin 2e glycosphingolipid receptors of primary porcine brain endothelial cells and toxin-mediated breakdown of the blood-brain barrier. *Glycobiology* 2013; doi: 10.1093/glycob/cwt013.

[2] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 671-676.

[3] Meuth SG, Göbel K, Kanyshkova T, Ehling P, Ritter MA, Schwindt W, Bielaszewska M, Lebedz P, Coulon P, Herrmann AM, Storck W, Müthing J, Pavenstädt H, Kuhlmann T, Karch H, Peters G, Budde T, Wiendl H, Pape HC. Thalamic involvement in patients with neurologic impairment due to Shiga toxin-producing *E. coli*. *Ann Neurol* 2012; doi: 10.1002/ana.23814.

XXX.

Strukturaufklärung der Shiga Toxin-Rezeptoren von Verozellen und Expressionsanalyse der Rezeptor-relevanten Glykosyltransferasen

Catherine-Louise Schepers¹, Gottfried Pohlentz¹, Ivan U. Kouzel¹, Jana Runde², Katja Neukirch¹, Hans-Ulrich Humpf², Helge Karch¹ und Johannes Müthing¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

² Institut für Lebensmittelchemie, Corrensstraße 45, Universität Münster, D-48149 Münster

e-Mail: Catherine-Louise.Schepers@ukmuenster.de

Keywords: Epithelzellen, Shiga Toxin, Globotriaosylceramid

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind für schwere intestinale Infektionen verantwortlich, die schlimmstenfalls das lebensbedrohliche hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen und zum Tode führen können [1]. Die Nierenendothel-schädigende Wirkung beruht auf den von EHEC produzierten Shiga Toxinen (Stx), für die in der Literatur häufig noch die Begriffe „Verotoxine“ oder „Verocytotoxine“ benutzt werden. Diese „archaischen“ Bezeichnungen leiten sich von Verozellen ab, für die die zytotoxische Wirkung eines zur damaligen Zeit noch wenig charakterisierten Zytotoxins aus pathogenen, HUS-auslösenden *E. coli* zuerst beschrieben wurde. Bei „Verozellen“ handelt es sich um etablierte Affenepithelzelllinien, die aus der Niere der Grünen Meerkatze stammen und die weltweit am häufigsten eingesetzten Targetzellen für Zytotoxizitätsstudien von Stx und anderen EHEC-Virulenzfaktoren darstellen [2]. Das Glykosphingolipid (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) wurde bereits Ende der 1980er Jahre als spezifischer Stx-Rezeptor in Verozellen identifiziert. Da bis heute weder Strukturdaten zu den Stx-Rezeptoren noch Ergebnisse zur Expression der Rezeptor-relevanten Glykosyltransferasen von Verozellen vorliegen, werden von uns in diesem Beitrag erstmalig die mittels Massenspektrometrie und immunchemischen Methoden ermittelten Strukturen der verschiedenen Gb3Cer- und Gb4Cer-Lipoformen von Verozellen präsentiert. Die detektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Varianten ähneln den Stx-Rezeptoren von humanen Hirn- und Nierenendothelzellen, die von uns unlängst beschrieben wurden [3]. PCR-Analysen von Verozellen zeigten die Expression der für die Synthese von GSL der Globo-Serie erforderlichen Glykosyltransferasen. Welche funktionelle Rolle die verschiedenen GSL-Lipoformen für die Stx-vermittelte Schädigung von Verozellen spielen, soll zukünftig in weiterführenden Studien gezeigt werden.

[1] Bielaszewska M, Karch H. Consequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection for the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 2005; 94: 312-318.

[2] Bielaszewska M, Stoewe F, Fruth A, Zhang W, Prager R, Brockmeyer J, Mellmann A, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2061-2066.

[3] Bauwens A, Betz J, Meisen I, Kemper B, Karch H, Müthing J. Facing glycosphingolipid-Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 425-457.

XXXI.

Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin-Rezeptoren humaner Nierenendothelzellen mit ungewöhnlicher molekularer Anordnung in der Zellmembran

Michael Mormann¹, Josefine Betz¹, Andreas Bauwens¹, Lisa Kunsmann¹, Martina Bielaszewska¹, Iris Meisen¹, Hans-Ulrich Humpf², Helge Karch¹, Alexander W. Friedrich¹, Johannes Müthing¹

¹ Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

² Institut für Lebensmittelchemie, Corrensstraße 45, Universität Münster, D-48149 Münster
e-Mail: mmormann@uni-muenster.de

Keywords: Massenspektrometrie, Glykosphingolipide, Lipid Rafts

Shiga Toxine (Stx) sind die Hauptvirulenzfaktoren von EHEC, die schwerste Erkrankungen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen, das hauptsächlich auf der Schädigung der glomerulären mikrovaskulären Endothelzellen (*glomerular microvascular endothelial cells*, GMVECs) beruht. Mithilfe der Dünnschichtchromatographie, kombiniert mit einem immunchemischen Nachweisverfahren und der Massenspektrometrie [1], wurden die Glykosphingolipide (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer) als Stx-Rezeptoren in GMVECs identifiziert. Sowohl für Gb3Cer als auch für Gb4Cer wurden unterschiedliche Lipiformen des Ceramidteils nachgewiesen, wobei bei beiden Stx-Rezeptoren die Varianten mit Sphingosin (d18:1) und den Fettsäuren C16:0 sowie C24:1/C24:0 die Hauptkomponenten darstellten [2], die zuvor auch in humanen mikrovaskulären Hirnendothelzellen (*human brain microvascular endothelial cells*, HBMECs) detektiert wurden [3]. Im Gegensatz zu HBMECs, bei denen die Stx-Rezeptoren als Mikrodomänen- bzw. Lipid Raft-assoziierte Strukturen vorliegen, zeigten GMVECs eine ungewöhnliche Membranverteilung von Gb3Cer und Gb4Cer, die auf eine singuläre Verteilung beider GSL in der Plasmamembran hinweisen. Das Dogma, dass eine Lipid Raft-Assoziation für die Zellschädigung durch Stx essentiell ist, konnte somit von uns zwar für HBMECs, nicht aber für GMVECs bestätigt werden [2, 3]. Aufgrund der Tatsache, dass GMVECs eine höhere Sensitivität gegenüber Stx aufweisen, stellen sich neue Fragen bezüglich der funktionellen Bedeutung der unterschiedlichen Mikrodomänen-Assoziation der Stx-Rezeptoren in HBMECs und GMVECs.

[1] Meisen I, Mormann M, Müthing J. Thin-layer chromatography, overlay technique and mass spectrometry: a versatile triad advancing glycosphingolipidomics. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1811: 875-896.

[2] Betz J, Bauwens A, Kunsmann L, Bielaszewska M, Mormann M, Humpf HU, Karch H, Friedrich AW, Müthing J. Uncommon membrane distribution of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in toxin-sensitive human glomerular microvascular endothelial cells. *Biol Chem* 2012; 393: 133-147.

[3] Betz J, Bielaszewska M, Thies A, Humpf HU, Dreisewerd K, Karch H, Kim KS, Friedrich AW, Müthing J. Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *J Lipid Res* 2011; 52: 618-634.

XXXII.

Identifizierung der Substratbindungsdomänen des Typ III Effektorproteins NleD

Kristina Creuzburg, Sabrina Mühlen, Elizabeth L. Hartland

Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia

Mit Hilfe eines Typ III Sekretionssystems sind Shiga Toxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) und enteropathogene *E. coli* (EPEC) in der Lage im Gastrointestinaltrakt eine lokale Zerstörung der Mikrovilli, sowie die Umorganisation des Aktinzytoskeletts induzieren. Durch dieses Sekretionssystem werden Effektoren aus dem bakteriellen Zytoplasma direkt in die eukaryotische Wirtszelle transloziert. Die Effektorproteine interferieren mit unterschiedlichen Signalwegen der Wirtszelle und tragen so zur Virulenz von STEC und EPEC bei. Einige Effektoren, die in Assoziation mit verschiedenen Prophagen im Genom pathogener *E. coli* auftreten, hemmen die Immunantwort der Wirtszelle, indem sie verschiedene Komponenten inflammatorischer Signalwege angreifen. Bei dem Effektor NleD handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease, die spezifisch die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPKs) JNK und p38 spaltet. Diese Spaltung führt zur Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Domänen des Effektorproteins NleD, die für die Substratbindung verantwortlich sind. Hierfür wurde, unter Verwendung eines Transposon-basierten Mutagenese-Systems, eine Mutanten-Bibliothek des Gens *nleD* in einem eukaryotischen Expressionsvektor erstellt. Mit Hilfe dieses Systems wurden fünf zusätzliche Aminosäuren an zufälligen Positionen in die Proteinsequenz von NleD eingefügt. Nach Transfektion in eine humane Zelllinie wurden die 55 erzeugten Mutanten mittels Western Blot, auf ihre Fähigkeit JNK und p38 zu spalten, untersucht.

Die Analyse der Transposonmutanten führte zur Identifizierung von Aminosäuren an fünf verschiedenen Positionen des Proteins, die eine Rolle bei der Substratbindung von NleD spielen. Während Mutationen, die eine Verringerung der Spaltungsaktivität von NleD bewirkten, vor allem im N-terminalen Bereich des Proteins nachgewiesen werden konnten, führten Mutationen im C-terminalen Bereich von NleD zu einer vollständigen Blockierung der Spaltungsaktivität dieses Proteins.

XXXIII.

Human plasmatic coagulation is significantly impaired by EHEC-derived Shiga toxin 2

M. Berktold^{1*}, C. Speth¹, W. Streif², D. Fries³, J. Martini³, R. Würzner¹, D. Orth-Höller¹

¹ Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Austria

² Department of Pediatrics II, Innsbruck Medical University, Austria

³ Department of General and Surgical Critical Care Medicine, Innsbruck Medical University, Austria

Keywords: Enterohämorrhagischer *Escherichia coli*, Shigatoxin 2, Thrombozyten, plasmatische Gerinnung, Antithrombin

Infection with Shiga toxin producing *Escherichia coli* (EHEC) is the most important cause for typical hemolytic uremic syndrome (HUS). HUS is defined by renal injury due to damage of renal endothelial cells caused especially by Shiga toxin 2 (Stx2). Consecutively the coagulation system is activated. It has also been postulated, that Stx itself acts as an activator of blood platelets. However, there are also hints that the plasmatic coagulation system is affected in HUS.

In this study the effect of Stx2 on platelets, on the plasmatic coagulation and on antithrombin (AT), a strong inhibitor of the plasmatic coagulation cascade was investigated. Stx2 was incubated with platelet-rich-plasma (PRP) and aggregometry was performed to evaluate the aggregation inducing capacity of Stx2. In flow cytometry, activation of platelets was investigated measuring the expression of two platelet-activation markers, CD62P (P-selectin) and CD63. For evaluation of a possible impairment of the plasmatic coagulation due to Stx2, thromboelastometry (ROTEM) analyses with platelet-poor-plasma (PPP) were performed and Coagulation Time (CT) and Clot Formation Time (CFT) were measured. ELISA was performed to evaluate a binding of antithrombin (AT) to Stx2. Neither in aggregation, nor in the expression of the investigated activation markers CD62P and CD63, a Stx2 induced effect on platelets could be recorded. In ROTEM a clear reduction of both, the Coagulation Time (CT) and the Clot formation Time (CFT) in PPP was observed. In addition, ELISA revealed a strong binding of AT to Stx2. Stx2 is not able to activate human platelets *in-vitro*. However, a strong binding of AT to Stx2 was observed. A reduction of both CT and CFT in ROTEM under influence of Stx2 points towards a significant functional correlate of the Stx2-AT binding. We hypothesize, that in HUS-associated thrombotic disorders, Stx2 has a direct and possibly significant impact on the plasmatic branch of the coagulation system.

XXXIV.

Comparative analysis of wildtype ESBL- *E.coli* strains and their plasmid-cured variants (PCV)

Katharina Schaufler¹, Torsten Semmler¹, Lothar H. Wieler¹, Christa Ewers²,
Sebastian Guenther¹

¹ Institute of Microbiology and Epizootics, Freie Universität Berlin, Philippstr. 13, 10115 Berlin, Germany;

² Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus-Liebig-Universität Giessen, Frankfurter Str. 85-89, D-35392 Giessen, Germany

Keywords: ESBL, ST131, ST648, ESBL-Plasmids

Purpose: The success of Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli* in extraclinical settings cannot only be explained by antimicrobial resistance and thus other metabolic features and virulence factors seem to play an important role. The aim of this study was to investigate the influence of ESBL-encoding plasmids on non-resistance factors using wildtype ESBL-*E.coli* strains and constructed ESBL-plasmid-free variants of sequence types ST131 and ST648.

Methods: Twenty plasmid-cured variants (PCV) were generated using wildtype ESBL-*E.coli* strains from different sources such as humans, companion and wild animals. Therefore the strains were subcultured in BHI medium at 45°C daily. To confirm the loss of the plasmid, plasmid characterization was performed and the genetic identity of wildtype and its corresponding PCV strain was analyzed through pulsed-field-gelelectrophoresis and whole genome sequencing. Wildtype strains were compared to PCV strains by growth curves, adhesion/invasion-, motility and biofilm production assays.

Results and conclusions: Concerning growth curves and invasion assays the compared strains did not demonstrate significant differences. These results point towards low metabolic costs in carriage of the ESBL-plasmid. Preliminary data did, however, show relatively enhanced biofilm production in the wildtype strains compared to corresponding PCV strains. Our future work will focus on these non-resistance factors, like biofilm production, to understand other features than only resistance as important reasons for the success of ESBL-*E.coli* in extraclinical environments.

Referenten und Moderatorenverzeichnis

A

Adam, Hannah

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Ammon, Dr. Andrea

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)

Tomtebodavägen 11A, S – 17183 Stockholm

B

Barth, Dr. Stefanie

Institut für molekulare Pathogenese,

Friedrich-Löffler-Institut

Naumburger Straße 96 a, 07433 Jena

Bastert, Olaf

IDT Biologika GmbH

Geschäftsbereich Tiergesundheit, F & E,

Am Pharmapark, 06861 Dessau-Rosslau

Bauerfeind, Prof. Dr. Rolf

Justus-Liebig-Universität Giessen

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen

Bauwens, Dr. Andreas

Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Berktold, Dr. Michael

Abteilung für Bakteriologie, Mykologie und Parasitologie

Medizinische Universität Innsbruck

Schöpfstrasse 41/II., 6020-Innsbruck

Bielaszewska, PD Dr. Martina

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

Bletz, Stefan

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

Busch, Dr. Ulrich

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

Böhnlein, Dr. Christina

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max-Rubner Institut
E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach

C

Creuzburg, Dr. Kristina

Department of Microbiology and Immunology
University of Melbourne
Parkville, Victoria 3010, Australia

D

Dobrindt, Prof. Dr. Ulrich

Institut für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Dracopoulos, Christoph

Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Ratzeburger Allee 160, 23539 Lübeck

Düker, Felicitas

Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Str. 9235392 Gießen

E

Eichhorn, Inga

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

F

Frank, Dr. Christina

Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionsepidemiologie
Seestraße 10, 13353 Berlin

Fruth, Dr. Angelika

Robert Koch-Institut
Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger
Burgstrasse 37, 38855 Wernigerode

Funk, Joshua

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Universität Stuttgart-Hohenheim
Garbenstraße 28, 70599 Stuttgart

G

Geue, Dr. Lutz

Friedrich-Löffler-Institut
Institut für Epidemiologie
Seestr. 55, 16868 Wusterhausen

H

Hächler, Prof. Dr. Herbert

Institute for Food Safety and Hygiene
Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zurich

Hauser, Dr. Elisabeth

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

Hauswaldt, Dr. Susanne

Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck

Hautmann, Dr. Wolfgang

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

Hingst, Prof. Dr. Volker

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

Huber, Dr. Ingrid

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

Hummerjohann, Dr. Jörg

Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern

I, J

K

Karch, Prof. Dr. Dr. h. c. Helge

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene und Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF)

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Konrad, Dr. Regina

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Kossow, Dr. Annelene

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster

Kouzel, Ivan U.

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Robert Koch-Str. 41, 48149 Münster

Kuczius, Prof. Dr. Thorsten

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Robert Koch-Str. 41, 48149 Münster

Kunsmann, Lisa

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Robert Koch-Str. 41, 48149 Münster

L

Lindner, Dr. Ulrich

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Universität Lübeck

Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck

M

Martin, Annett

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Fachgruppe Epidemiologie, Biometrie und mathematische Modellierung

Max-Dohrn-Straße 8–10, 10589 Berlin

Mauder, Norman

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS)

Schaflandstraße 3/ 2, 70736 Fellbach

Meisen, Dr.Iris

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Molinaro, Sonja

MocroCoat Biotechnologie GmbH

Am Neuland 3, 82347 Bernried

Mormann, Dr. Michael

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Müller, Dr. Britta

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Müthing, Prof. Dr. Johannes

Universitätsklinikum Münster

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

N

Neubauer, Sabine

Nationale Referenzzentrale für *E. coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*,
Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit,
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Graz
Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

Nüesch-Inderbinen, Magdalena

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

O

Orth-Höllner, Dr. Dorothea

Universität Innsbruck
Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Schöpfstr. 41, A-6020 Innsbruck

P

Peters, Prof. Dr. Georg

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Münster
Domagkstraße 10, 48149 Münster

Pichner, Dr. Rohtraud

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner Institut, Dienststelle Kulmbach

Pohlentz, Dr. Gottfried

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

Prager, Dr. Rita

National Reference Centre for Salmonella and other Enteric Bacterial Pathogens
Division of Bacterial Infections, Robert Koch-Institut,
Burgstr. 37, D-38855 Wernigerode

Preußel, Dr. Karina

Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Infektionsepidemiologie
DGZ-Ring 1, 13086 Berlin

Pulz, Dr. Matthias

Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (LGA)
Rosebeckstraße 4-6, 30173 Hannover

Q, R

S

Schaufler, Katharina

Institute of Microbiology and Epizootics
Freie Universität Berlin
Philippstr. 13, 10115 Berlin

Schepers, Catherine-Louise

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

Schlager, Dr. Sabine

Nationale Referenzzentrale für *E. coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*,
Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit,
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Graz
Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

Schmidt, Prof. Dr. Herbert

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

Schmithausen, Dr. Ricarda

Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und
Parasitologie Universitätsklinikum Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, Bonn

Sing, Prof. Dr. Dr. Andreas

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

Stefanowski, Dr. Hannes

MVZ Labor Limbach München,
Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie (BÄMI)
Richard-Strauss-Straße 80-82, 80679 München

Stelter, PD Dr. Felix

Labor Schottdorf MVZ GmbH
August-Wessels-Straße 5, 86154 Augsburg

Stephan, Prof. Dr. Roger

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

T, U, V

W

Weissensteiner, Gudrun

Nationale Referenzzentrale für *E. coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*,
Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit,
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Graz
Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

Werber, Dr. Dirk

Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionsepidemiologie
DGZ-Ring 1, 13086 Berlin

Wieler, Prof. Dr. Lothar

Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen

Philippstraße 13, 10115 Berlin

Wilking, Dr. Hendrik

Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionsepidemiologie

DGZ-Ring 1, 13086 Berlin

Würzner, Prof. Dr. Reinhard

Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie,

Medizinische Universität Innsbruck

Fritz-Pregl-Str. 3, A-6020 Innsbruck

X, Y

Z

Zhang, Dr. Wenlan

Universitätsklinikum Münster

Institut für Hygiene

Robert Koch-Str. 41, 48149 Münster

Zapf, Dr. Andreas

Präsident des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

**Bisher sind in dieser Publikationsreihe folgende Publikationen erschienen:
(www.lgl.bayern.de/publikationen/index.htm)**

I. EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth 22.-24. Juli 2004

II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth 09.-11. Mai 2007

III. EHEC-Workshop 2010, Wildbad Kreuth, 16.-18. Juni 2010

sowie die vorliegende Publikation

IV. EHEC-Workshop 2013, Wildbad Kreuth, 12.-14. Juni 2013

**Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)**

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

91058 Erlangen
Eggenreuther Weg 43

85764 Oberschleißheim
Veterinärstraße 2

80538 München
Pfarrstraße 3

97082 Würzburg
Luitpoldstraße 1