



III. EHEC-Workshop 2010

Wildbad Kreuth, 16. - 18. Juni 2010

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen
Telefon: 09131 764-0
Telefax: 09131 764-102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Druck: Kaiser Medien GmbH, Nürnberg
Stand: Juni 2010

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, alle Rechte vorbehalten

Gedruckt auf Papier aus 100% Altpapier.

Autorinnen und Autoren des Berichts:

Alle Manuskripte sind namentlich gekennzeichnet.

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Ulrich Busch

Telefon: 089/31560-234

E-Mail: ulrich.busch@lgl.bayern.de

ISBN 978-3-942018-11-1 Druck Ausgabe

ISBN 978-3-942018-12-8 Internet Ausgabe

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

Grußworte	3
Tagungsprogramm	5
Einführung/Vorwort	11
Festvortrag	13
A - Abstracts – Epidemiologie und Klinik	14
B - Abstracts – Nachweisverfahren und Diagnostik	23
C - Abstracts – EHEC und Lebensmittel	27
D - Abstracts – EHEC in Tier und Umwelt	31
E - Abstracts – Pathogene <i>E. coli</i>	35
F - Abstracts – Pathogenitätsfaktoren und Genomics	39
G - Abstracts – Poster	46
Referenten und Moderatorenverzeichnis	74

Grußworte

Grußworte des Präsidenten des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Dr. Andreas Zapf

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“, „Systematik, Populationsgenetik und Infektiologie“ und „Zoonosen“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie sowie der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, dem „Österreichischen Referenzzentrum für EHEC/VTEC/STEC“ in Innsbruck und dem „Österreichischen Referenzlabor für E. coli einschließlich Verotoxin bildender E. coli“ in Graz und dem Nationalen Zentrum für enteropathogene Bakterien (NENT) in Zürich den III. EHEC-Workshop 2010 in Wildbad Kreuth.

Damit treffen sich wieder alle namhaften Experten aus der Schweiz, Österreich und Deutschland in Wildbad Kreuth, um aus der Sicht der unterschiedlichen Fachdisziplinen die Problematik von EHEC-Infektionen unter den Aspekten Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Umwelt, Lebensmittel, Genomics und Pathogenitätsfaktoren aufzuzeigen und Lösungsmöglichkeiten zu diskutieren. Durch das hochkarätig besetzte Sprecherfeld ist die Veranstaltung dazu prädestiniert, den Öffentlichen Gesundheitsdienst zu unterstützen, Managementaufgaben im Rahmen der Infektiologie einschließlich Epidemiologie und Diagnostik zu optimieren und eine aktive Politikberatung zu gewährleisten. Dem öffentlichen Gesundheitsdienst kommt damit eine zentrale Rolle zwischen Wissenschaft, Politik und Öffentlichkeit zu, um die wissenschaftlich erforschten Grundlagen für die Anwendungen im ÖGD nutzbar zu machen und so für eine gesundheitspolitische Umsetzung vorzubereiten. Die Veranstaltung des III. EHEC-Workshops 2010 zeigt exemplarisch die neuen Aufgaben des LGL, das sich von einem reinen Diagnostikzentrum zu einer modernen Managementbehörde im Öffentlichen Gesundheitswesen weiterentwickelt hat.

Besonders deutlich wird dies durch die Vernetzung des LGL mit verschiedenen bayerischen Universitäten, wie z. B. der Kooperationsvereinbarung mit der Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München. Den bisherigen Höhepunkt dieser Entwicklung stellt die Gründung der „Pettenkofer School of Public Health München“ (PSPH-LMU) als regionales Zentrum der interdisziplinären Gesundheitsforschung dar, das gemeinsam von der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, dem LGL sowie dem Helmholtz Zentrum München getragen wird. Das LGL ist darüber hinaus Sitz des Nationalen Referenzzentrums für Borrelien und der Konsiliarlaboratorien für Diphtherie und Ehrlichien und zeigt damit seine Stärken in der internationalen Wissenschaftsgemeinschaft. Die Vernetzung und die Zusammenarbeit und Kooperation mit anderen Institutionen ist ein wichtiges Element, um die Anforderungen an den Öffentlichen Gesundheitsdienst im 21. Jahrhundert im Spannungsfeld zwischen Wissenschaft, Politik und Öffentlichkeit erfolgreich zu bewältigen.

Ich wünsche dem III. EHEC-Workshop 2010 in Wildbad Kreuth eine fachlich interessante, erfolgreiche und angenehme Tagung sowie viele interessante und anregende Gespräche.

Tagungsprogramm

Mittwoch, 16. Juni 2010

- ab 17⁰⁰ Anmeldung
- ab 18⁰⁰ Begrüßung
Grußwort.
Dr. A. Zapf, Präsident LGL
- 19⁰⁰ - 20⁰⁰ Festvortrag
Molekulare Analyse von STEC am Interface „Lebensmittel – Mensch“
H. Schmidt, Stuttgart
- anschließend gemütliches Beisammensein

Donnerstag, 17. Juni 2010

Epidemiologie

Vorsitz: *M. Wildner, K. Stark*

- 9⁰⁰ – 9²⁰ Altersbestimmung von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157
H. Karch et al., Münster
- 9²⁰ - 9⁴⁰ Durchfall verzweifelt gesucht: Ausbruch von hämolytisch-urämischem-Syndrom durch Sorbitol-fermentierte *Escherichia coli* O157 – Deutschland 2009
S. Nielsen et al., Berlin
- 9⁴⁰-10⁰⁰ Surveillance von STEC-Erkrankungen in Deutschland 2001-2009: Time for a change
D. Werber et al., Berlin
- 10⁰⁰ - 10²⁰ Management von lebensmittelbedingten Ausbrüchen am Beispiel einer Häufung von EHEC-Erkrankungen nach einem Schulausflug
M. Kirchner et al., Hannover
- 10²⁰ - 10⁴⁰ Molekulare Epidemiologie enterohämorrhagischer *Escherichia coli* O157 in Deutschland im Zeitraum von 1987 bis 2008
C. Jenke et al., Münster
- 10⁴⁰ - 11⁰⁰ Diskussion
- 11⁰⁰ - 11³⁰ Kaffeepause

Epidemiologie und Klinik

Vorsitz: *H. Karch, V. Hingst*

- 11³⁰ - 11⁵⁰ Langzeitfolgen des EHEC assoziierten HUS: Todesfälle, chronische Niereninsuffizienz und Nierentransplantation
L. H. Zimmerhackl, Innsbruck
- 11⁵⁰ - 12¹⁰ O26 assoziiertes HUS: akute Präsentation und Langzeitverlauf der Erkrankung
A. Rosales, Innsbruck
- 12¹⁰ - 12³⁰ Diskussion
- 12³⁰ - 14⁰⁰ Mittagspause

EHEC-Workshop 2010

Wildbad Kreuth, 16.-18. Juni 2010

Nachweisverfahren und Diagnostik

Vorsitz: *R. Bauerfeind, A. Fruth*

- 14⁰⁰ - 14¹⁵ Untersuchungen zur Spezifität eines immun-chromatografischen Schnelltests zum Nachweis von Shigatoxinen und des *E. coli* O157 Antigens
L. Beutin et al., Berlin
- 14¹⁵ - 14³⁰ Hochsensitiver Nachweis unterschiedlicher Antigene in Untersuchungsproben durch die Immuno-PCR Technik
T. Kuczius et al., Münster
- 14³⁰ - 14⁴⁵ Entwicklung neuer Phagenproteine zur verbesserten Detektion von sechs nicht-O157 EHEC Serotypen
S. Leopoldseder et al., München
- 14⁴⁵ - 15⁰⁰ Diskussion

EHEC und Lebensmittel

Vorsitz: *L. Beutin, R. Stephan*

- 15⁰⁰ - 15¹⁵ Ergeben die Eigenschaften von STEC aus tierischen Lebensmitteln Hinweise auf die mögliche Kontaminationsquelle?
A. Martin et al., Berlin
- 15¹⁵ - 15³⁰ Rückverfolgung lebensmittelassoziierter EHEC-Infektionen, Möglichkeiten der Veterinärbehörden
G. Schleuter, Oldenburg
- 15³⁰ - 15⁴⁵ Nachweis sowie rechtliche Beurteilung von STEC/VTEC in pflanzlichen Lebensmitteln
U. Messelhäuser et al., Oberschleißheim
- 15⁴⁵ - 16⁰⁰ Diskussion
- 16⁰⁰ - 16³⁰ Kaffeepause

EHEC in Tier und Umwelt

Vorsitz: *G. Baljer, L. Wieler*

- 16³⁰ - 16⁴⁵ Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen: Forschung stärken – Wissen verknüpfen
G. Benninger et al., Münster
- 16⁴⁵ - 17⁰⁰ Microarray-basierte Genotypisierung von EHEC O156:H25/H-/Hnt isoliert in deutschen Rinderbeständen und Untersuchungen zu deren räumlichen und zeitlichen Zusammenhängen
L. Geue et al., Wusterhausen
- 17⁰⁰ - 17¹⁵ Vorkommen und Eigenschaften von Intimin-kodierenden *E.coli*-Stämmen bei Schweinen in Deutschland
S. Barth et al., Giessen
- 17¹⁵ - 17³⁰ Diskussion
- 17³⁰ - 17⁴⁵ Verleihung der Posterpreise
- Ab 19⁰⁰ Abendprogramm

Freitag, 18. Juni 2010**Pathogene *E. coli***Vorsitz: *R. Würzner, H. Hächler*

- 8³⁰ - 8⁵⁰ Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (ATEC) – ‚lost in translation‘?
A. Schmidt, Münster
- 8⁵⁰ - 9¹⁰ Close relationship between murine atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) and human aEPEC: are rodent aEPEC zoonotic pathogens?
L. H. Wieler et al., Berlin
- 9¹⁰ - 9³⁰ Results from studies on antimicrobial resistant *E. coli* from wildlife rodents
S. Guenther, Berlin
- 9³⁰ - 9⁴⁵ Diskussion
- 9⁴⁵ - 10¹⁵ Kaffeepause

Pathogenitätsfaktoren und GenomicsVorsitz: *S. Schlager, A. Friedrich*

- 10¹⁵ - 10⁴⁰ Neue massenspektrometrische Strategien zur Strukturaufklärung von Glykosphingolipid-Rezeptoren bakterieller Exotoxine
J. Müthing et al., Münster
- 10⁴⁰ - 11⁰⁰ Komplementaktivierung und Reduktion der Faktor H-Zellschutzfunktion durch Shigatoxin 2
R. Würzner et al., Innsbruck
- 11⁰⁰ - 11²⁰ EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5
D. Orth et al., Innsbruck
- 11²⁰ - 11³⁰ Diskussion

Pathogenitätsfaktoren und GenomicsVorsitz: *D. Orth, A. Schmidt*

- 11³⁰ - 11⁵⁰ Neue Bildgebungsverfahren zur Darstellung der Wirkungsweise von Shiga Toxin 1 und Shiga Toxin 2
A. Bauwens et al., Münster
- 11⁵⁰ - 12¹⁰ Clonal diversity of clinical Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O91 isolates
M. Bielaszewska et al., Münster
- 12¹⁰ - 12³⁰ Comparison of non sorbitol-fermenting and sorbitol-fermenting EHEC O157:H7/Hnm strains using oligonucleotide microarrays
S. Schlager et al., Graz
- 12³⁰ - 12⁴⁵ Diskussion und Abschluss der Tagung
- 12⁴⁵ - 14⁰⁰ Mittagessen

Posterpräsentationen

Epidemiologie und Klinik

Phenotypic and genotypic characterization of human clinical O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated between 2000 and 2009 in Switzerland

U. Käppeli et al., Zürich

Multilocus sequence types and further characteristics of sorbitol-fermenting *E. coli* O157:nonH7 isolates from cattle, pig and sheep

R. Stephan et al., Zürich

Risikofaktoren für Langzeitprobleme des EHEC assoziierten HUS

A. Rosales et al., Innsbruck

Zur Möglichkeit einer pharmakologischen Eradikation bei Dauerausscheidern von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)

F. Wiedemann et al., Oberschleißheim

Nachweisverfahren und Diagnostik

Phagenligand-basierende selektive Voranreicherung (AMS) für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 nach DIN 10167 sowie für den Nachweis mittels Real-time PCR

M. Schütz et al., Regensburg

Simultaner Nachweis von EHEC und EPEC Isolaten mit Multiplex Real-Time PCR

M. Pavlovic et al., Oberschleißheim

EHEC und Lebensmittel

Tierische Lebensmittel als Quelle von STEC Infektionen des Menschen: Besteht ein Zusammenhang zwischen Lebensmittelkategorie und humanpathogenem Potential der STEC?

A. Martin et al., Berlin

Vergleichende Untersuchungen von STEC/VTEC und EHEC bei Mensch, Tier und Lebensmitteln im Rahmen der amtlichen Überwachung (2005 – 2010)

U. Messelhäuser et al., Oberschleißheim

EHEC in Tier und Umwelt

In vitro-Evaluation von rekombinanten *E. coli* Shigatoxinen als Impfstoffkandidaten für Rinder

K. Kerner et al., Giessen

Wirkung von *Escherichia (E.) coli* Shigatoxin 1 auf bovine Makrophagen in vitro

D. Loos et al., Giessen

Shiga-toxin bildende *Escherichia coli* bei Milchvieh: Ausscheidungsmuster und Einflussfaktoren

A. Menrath et al., Kiel

Mathematical models for the emergence and persistence of VTEC in German beef calves

L. Geue et al., Wusterhausen

Shigatoxin (Stx-) Bildung bei Stx2e-kodierenden *Escherichia coli* (EDEC)-Stämmen von Schweinen

J. Fröhlich et al., Giessen

EHEC in Tier und Umwelt

Shigatoxin-Subtypen und Virulenzfaktoren oviner und capriner STEC-Isolate

E. Stüber et al., München

Etablierung der Serotypisierung der Verotoxin produzierenden *Escherichia coli*-Isolate aus dem Österreichischen Zoonose-Monitoring 2009

S. Fink et al., Graz

Pathogene *E.coli*

Comparative analyses of Genomic O Island (OI) 122 in LEE positive Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) from cattle

K. Heidemanns et al., Berlin

Duplex-PCR zur Differenzierung von *Escherichia coli* und *Shigella* spp.

M. Pavlovic et al., Oberschleißheim

Pathogenitätsfaktoren und Genomics

Verbreitung von Typ III Effektorgenen pathogener *Escherichia coli* aus humanen, tierischen sowie Lebensmittelproben unter phylogenetischen Aspekten

K. Creuzburg et al., Stuttgart

Untersuchung differentieller Proteinexpression enterohämorrhagischer *E. coli* mittels 2D-Gelelektrophorese

S. Polzin et al., Stuttgart

fliC types of clinically important non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*

W. Zhang et al., Münster

Expression von Shiga Toxin-Rezeptoren in humanen Karzinomzelllinien der Bauchspeicheldrüse

W. Storck et al., Münster

Verbreitung der Gene des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG und Expression unterschiedlicher Phänotypen bei Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*

V. Merkel et al., Münster

In vivo-Evolution und Genomsequenzen enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) O26:H11 und O145:H28

S. Bletz et al., Münster

Reduktion der Oberflächenexpression der Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 auf Tubulusepithelzellen durch Shigatoxin 2

S. Ehrlenbach, R. Würzner and D. Orth, Innsbruck

Das molekulare Arrangement von Glykosphingolipid-Rezeptoren in lipid rafts beeinflusst die biologische Wirkung von Shiga Toxinen

J. Betz et al., Münster

Einführung, Vorwort

Dr. Ulrich Busch

Es ist mir eine besondere Freude, Sie anlässlich des III. EHEC-Workshops nach 2004 und 2007 wieder in Wildbad Kreuth begrüßen zu dürfen. Auch der III. EHEC-Workshop ist als interdisziplinäre Plattform für Wissenschaft, Behörden und Industrie gedacht, um neueste Erkenntnisse über die gesundheitlichen Folgen und die Auswirkungen von EHEC-Infektionen zu diskutieren und Lösungsstrategien zu entwickeln. Dabei wurde, wie schon beim zweiten Workshop, die Thematik um die weiteren pathogenen *Escherichia coli* ergänzt und damit als eigener Programmpunkt fest im Rahmen der EHEC-Tagung verankert. Daran soll deutlich gemacht werden, wie dynamisch der Austausch von unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren innerhalb der mikrobiellen Evolution vollzogen wird.

Auch dieses Mal konnte wieder auf die bewährte Teilnahme aller 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 Innsbruck und Graz und der Schweiz mit dem Zentrum für enteropathogenen Bakterien in Zürich zurückgegriffen werden. Dies zeigt eindrucksvoll die wissenschaftliche Bedeutung des Workshops. Die gemeinsame Tagung soll als Grundlage für einen intensiven wissenschaftlichen Dialog über Ländergrenzen hinweg dienen und Basis für die weitere gute Zusammenarbeit zwischen den beteiligten Medizinern, Veterinärmedizinern, Biologen und Biochemikern sein.

Wie die Erfahrungen der beiden vorherigen Workshops gezeigt haben, ist die Netzwerkbildung innerhalb der Wissenschaft von entscheidender Bedeutung.

Die Tatsache, dass alle Kolleginnen und Kollegen auch zum dritten Mal ins nicht gerade verkehrsgünstig gelegene Wildbad Kreuth kommen, zeigt deutlich, dass die Verknüpfungen innerhalb des Netzwerkes, die sich auch in gemeinsamen wissenschaftlichen Aktivitäten niedergeschlagen haben, als ganz wesentlich für die tägliche Arbeit angesehen werden müssen, da sie eine enge Zusammenarbeit zwischen ÖGD und Wissenschaft ermöglichen. Der wunderschöne Veranstaltungsort Wildbad Kreuth, der sich 2004 zunächst als eine Notlösung für den ersten Workshop ergeben hat, hat ganz wesentlich zu dem Gelingen dieser Veranstaltung beigetragen.

Eine solche Veranstaltung ist nicht möglich, ohne die zahlreichen helfenden Hände im Hintergrund. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Kalteis 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 die Mitarbeiterinnen des EHEC-Labors, Frau Meindl, Frau Wolf und Frau Fräßdorf, die durch ihre tägliche Arbeit in der EHEC-Diagnostik die Grundlage für die wissenschaftlichen Daten des LGL legen. 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 allen eine spannende und erkenntnisreiche Tagung in Wildbad Kreuth und bin mir sicher, dass die Inhalte der Vorträge und Poster auch noch abends in geselliger Runde intensiv diskutiert werden und so die Basis für eine intensive, länderübergreifende Zusammenarbeit darstellen, die dann in den IV. EHEC-Workshop 2013 münden können.

Festvortrag

Molekulare Analyse von STEC am Interface Lebensmittel-Mensch

Herbert Schmidt

*Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittel-
mikrobiologie, Universität Hohenheim, Garbenstrasse 28, 70599 Stuttgart*

Molekulare Methoden in der Diagnostik, in der Typisierung und der phylogenetischen Charakterisierung von Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC) haben detaillierte Einblicke in das genetische Repertoire von STEC hinsichtlich ihrer Virulenzgene, deren genetische Struktur und ihrer Populationsstruktur ermöglicht. Durch rasante technologische Entwicklungen können Genomsequenzierungen, Multilokussequenztypisierungen (MLST) und andere Hochdurchsatzanalysen in kürzester Zeit durchgeführt werden. Dennoch ist eine zuverlässige Risikoanalyse der STEC aufgrund ihres Virulenzgenspektrums bislang schwierig, nicht zuletzt aufgrund des hohen Grades des horizontalen Gentransfers. Trotz dieser Einschränkung ist es möglich, Zuordnungen von bestimmten Serotypen, Sequenztypen und spezifischen Virulenzgenen zu bestimmten Pathotypen vorzunehmen.

Hauptreservoir für STEC sind landwirtschaftliche Nutztiere, insbesondere Rinder und Ziegen, wobei der Hauptübertragungsweg über kontaminierte Nahrungsmittel, wie z.B. Hackfleisch und Rohmilch verläuft. Die STEC Bakterien passen sich beim Kolonisieren dieser unterschiedlichen Matrizes an verschiedene Umwelteinflüsse an. Die Überlebensfähigkeit von STEC in der Nahrungsmittelkette basiert vermutlich auf ihrer außerordentlich hohen Adaptationsfähigkeit. Im Rahmen des vom BMBF geförderten Zoonose Netzwerkes „FBI-Zoo“ wurden molekulare Untersuchungen an STEC-Lebensmittelisolaten im Vergleich mit Human- und Tierisolaten durchgeführt. Insbesondere wurde der Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die Expression bestimmter Virulenzgene, auf den Metabolismus und das Wachstum bestimmter STEC-Stämme untersucht. Darüber hinaus wurde durch die Auswertung von Multi-Locus-Sequenztypisierungsdaten, die Analyse von Virulenzgenen und die Auswertung von Basisdaten wie Herkunft und Serotyp an einem definierten Stammsatz gezeigt, dass bestimmte Muster vorkommen, die aber immer wieder von Ausnahmen durchbrochen werden. Die Resultate dieser Untersuchungen und Daten aus der Literatur zeigen, dass STEC Lebensmittelisolate häufig nur wenige der klassischen Virulenzgene, wie z.B. *eae*, *ehx* oder TypIII Effektorgene enthalten. Allerdings wurden andere Gene wie *subAB* oder *iha* häufig in Lebensmittelisolaten gefunden. Interessanterweise waren auch Isolate zu finden, die die gleichen Sequenztypen wie die Stämme von HUS-Patienten aufwiesen. Die molekularen Untersuchungen an den STEC-Lebensmittelisolaten lassen den Schluss zu, dass STEC-Isolate zukünftig mit molekular-biologischen Techniken genauer untersucht werden müssen, um das Gefahrenpotential, das von einer Übertragung von STEC über Lebensmittel auf den Menschen ausgeht, wissenschaftlich fundiert einschätzen zu können.

A

Abstracts – Epidemiologie und Klinik

- I. Altersbestimmung von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157
H. Karch et al., Münster
- II. Durchfall verzweifelt gesucht: Ausbruch von hämolytisch-urämischem-Syndrom durch Sorbitol-fermentierte *Escherichia coli* O157 – Deutschland 2009
S. Nielsen et al., Berlin
- III. Surveillance von STEC-Erkrankungen in Deutschland 2001-2009: Time for a change
D. Werber et al., Berlin
- IV. Management von lebensmittelbedingten Ausbrüchen am Beispiel einer Häufung von EHEC-Erkrankungen nach einem Schulausflug
M. Kirchner et al., Hannover
- V. Molekulare Epidemiologie enterohämorrhagischer *Escherichia coli* O157 in Deutschland im Zeitraum von 1987 bis 2008
C. Jenke et al., Münster
- VI. Langzeitfolgen des EHEC assoziierten HUS: Todesfälle, chronische Niereninsuffizienz und Nierentransplantation
LH. Zimmerhackl, Innsbruck
- VII. O26 assoziiertes HUS: akute Präsentation und Langzeitverlauf der Erkrankung
A. Rosales et al., Innsbruck

I.

Altersbestimmung von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157

Helge Karch¹, Shana Leopold², Philipp I. Tarr² und Alexander Mellmann¹

¹Institut für Hygiene und Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Universitätsklinikum Münster, Robert-Koch-Straße 41, 48149 Münster, Deutschland,

²Department of Pediatrics, Washington University in St. Louis, School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA

Keywords: EHEC O157:H7/H-, evolution, genome sequencing, typing

Um evolutive Prozesse im Infektionsverlauf von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) O157 besser zu verstehen, haben wir das Alter der Stämme einer globalen Kollektion von O157-Isolaten anhand der Unterschiede ihrer Genomsequenzen bestimmt. Sorbit-fermentierende (SF) EHEC O157:H⁻, die in Deutschland die meisten großen HUS-Ausbrüche verursacht haben, sind mit ca. 5 500 Jahren etwa so alt wie „Ötzi“. EHEC O157:H7 von Patienten mit Durchfallerkrankungen und HUS bestehen aus drei Clustern, die alle erheblich jünger sind. Das Cluster 1 ist vor ca. 2 500 Jahren entstanden, als wilde Germanenhorden unser Land durchstreiften. Dagegen sind EHEC O157:H7-Patientenisolate, die dem Cluster 2 angehören, nur ca. 200 Jahre alt. Cluster 3 ist der „Junior“ der drei Cluster und gerade erst vor ein paar Jahrzehnten entstanden. Mit diesen Daten können wir nun auch die globale Verbreitung von EHEC O157 nachvollziehen. So spricht vieles dafür, dass Erreger des Cluster 1 bereits um 1650 als blinde Passagiere im Darm von Rindern in die Neue Welt gelangt sind. Die weitere Entwicklung zu verschiedenen Clustern erfolgte in der Neuen Welt weitgehend unabhängig von der Clusterentwicklung in der Alten Welt. Im Rind gibt es zahlreiche symptomlose EHEC O157:H7-Cluster, wovon es aber bisher nur 3 geschafft haben, den Menschen kurzzeitig zu besiedeln und Erkrankungen hervorzurufen. Warum es nur bestimmten Clustern gelingt, als Grenzgänger die Speziesbarriere zu überwinden, ist noch ungeklärt.

II.

Durchfall verzweifelt gesucht: Ausbruch von hämolytisch-urämischem-Syndrom durch Sorbitol-fermentierte *Escherichia coli* O157 – Deutschland 2009

Stine Nielsen¹, Angelika Fruth², *Christina Frank*¹, Anke Spode³, Rita Prager², Andrea Graff⁴, Marc Lütgehetmann⁵, Dirk E. Müller-Wiefel⁵, Dirk Werber¹

¹Robert Koch-Institut, Abt. für Infektionsepidemiologie, Berlin

²Robert Koch-Institut, Abt. für Infektionskrankheiten, Wernigerode

³Gesundheitsamt Altona, Hamburg

⁴Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg

⁵Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Keywords: STEC, Epidemiologie, Fall-Kontroll-Studie, Ausbruch

Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC) O157 rufen Durchfallerkrankungen, vor allem bei Kindern, hervor; ~10% der Infizierten entwickeln das lebensbedrohliche hämolytisch-urämische-Syndrom (HUS). Die in Europa zunehmend beobachtete Sorbitol-fermentierende (Sf) Variante von STEC O157 war in der Vergangenheit für HUS-Ausbrüche ohne offensichtliche flankierende Fälle von Durchfallerkrankungen verantwortlich. Vom 23. bis 26. Juli 2009 wurde bei 4 Jungen in einem Hamburger Vorort HUS diagnostiziert, verursacht durch Sf-STEC O157. Unsere Untersuchung hatte zum Ziel, den Ausbruch zu stoppen und sein Ausmaß zu beschreiben.

Wir befragten, und sammelten Stuhlproben, von Haushalts-, Kindergarten- und Spielplatzkontakten, nahmen Umweltproben und führten eine Fall-Kontroll-Studie durch. Als Fälle definierten wir Einwohner des Hamburger Stadtteils mit HUS oder Sf-STEC O157 Infektion zwischen 23. Juli und 25. August 2009. Alters-gematchte Kontrollen wurden über Kindergärten und Aushänge im Viertel rekrutiert. Stuhl- und Umweltproben wurden auf Sf-STEC O157 untersucht.

Im Rahmen der Untersuchung von 242 Personen wurden insgesamt 9 Fälle identifiziert: 5 mit HUS, ein Kind mit Durchfallssymptomatik, sowie 3 asymptomatische Ausscheider. Der Altersmedian betrug 4 Jahre (0-13 Jahre), 8 der 9 waren Jungen. In der Fall-Kontroll-Studie (4 HUS-Fälle und 34 Kontrollen eingeschlossen) war HUS deutlich mit dem Besuch eines bestimmtem Spielplatzes am 16. Juli 2009 assoziiert (Odds Ratio=27, 95%CI:2,6-+INF, p-value<0,006); gemeinsame Mahlzeiten gab es nicht. Alle 12 Umweltproben waren Sf-STEC O157 negativ. Auch z.B. bei lokal tätigen Kinderärzten wurde kein Anstieg an Durchfallerkrankungen bemerkt.

In diesem lokalen Ausbruchsgeschehen wurden die Infektionen wahrscheinlich auf einem Spielplatz erworben - nicht durch den Verzehr eines Lebensmittels. Trotz extensiver Fallsuche konnte nur ein Sf-STEC O157 infiziertes Kind "nur" mit Durchfall identifiziert werden. Das Reservoir von Sf-STEC O157 bleibt weiterhin unbekannt. Nur eine zeitnahe HUS-Surveillance, die eine sensitive Labordiagnostik aller humanpathogenen STEC-Serotypen beinhaltet, kann derartige Ausbrüche frühzeitig erkennen und deren rechtzeitige Untersuchung ermöglichen.

III.

Surveillance von STEC-Erkrankungen in Deutschland 2001-2009: Time for a change

Dirk Werber¹, Angelika Fruth², Christina Frank¹, Doris Altmann¹, Klaus Stark¹

¹Robert Koch-Institut, Abt. für Infektionsepidemiologie, Berlin

²Robert Koch-Institut, Abt. für Infektionskrankheiten, Wernigerode

Keywords: STEC, EHEC, Surveillance

Einleitung: Deutschland ist eines der wenigen Länder, deren Diagnostik und Surveillance von Shigatoxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) Infektionen auf dem Screening von Shigatoxinen oder deren Genen basiert. Die derzeit gültige Empfehlung für die Diagnostik ist mehrstufig (Toxin(gen)-Nachweis, kulturelle Bestätigung, Subtypisierung inkl. Serotypie). Der Shigatoxin(gen)-Nachweis ist unverzüglich an das zuständige Gesundheitsamt zu melden, von wo aus die Meldung, via Landestelle, an das Robert Koch-Institut (RKI) übermittelt wird. Vorrangiges Ziel der STEC-Surveillance muss es sein, rechtzeitig Maßnahmen zur Verhinderung der Infektionsweiterverbreitung ergreifen zu können, weswegen Erkrankungen und Erkrankungshäufungen zeitnah erkannt werden müssen.

Methoden: Wir analysierten die STEC-Melddaten, die an das RKI von 2001 bis 2009 übermittelt wurden, und nahmen eine Teilevaluation der Surveillance im Hinblick auf Zeitnähe und Vollständigkeit der Serogruppeninformation vor.

Ergebnisse: Insgesamt wurden dem RKI 8993 STEC-Erkrankungen übermittelt, (~ 1 Erkrankung pro 100.000 Einwohner im Jahr). Die Meldeinzidenz war regional deutlich unterschiedlich und generell in Kreisen mit hoher Rinderdichte erhöht. Das Alter der übermittelten Fälle betrug im Median 5 Jahre (Interquartilsabstand [IQR]: 1-36), 51% waren weiblich. Informationen zur STEC-Serogruppe lagen für 42% der Meldefälle vor. Unter den 114 genannten Serogruppen waren O157 (20%), O103 (17%), O26 (15%) und O91 (8%) am häufigsten. Das Zeitintervall vom Erkrankungsbeginn bis zum Diagnosezeitpunkt betrug im Median 9 Tage (IQR: 5-16). Bei STEC O157-Infektionen vergingen im Median 21 Tage und bei non-O157 STEC-Infektionen 25 Tage, bis die Serogruppeninformation im Gesundheitsamt vorlag.

Schlussfolgerungen: Die derzeitige Surveillance (und Diagnostik) von STEC Infektionen liefert epidemiologische Basisinformationen zu allen in Deutschland vorkommenden STEC-Serogruppen. Allerdings liegt die Serogruppeninformation im Gesundheitsamt zu spät (aufgrund der mehrstufigen Diagnostik), häufig sogar überhaupt nicht vor. Dies verhindert eine zeitnahe Erkennung von Ausbrüchen. Desgleichen können Maßnahmen zur Verhinderung der Infektionsweiterverbreitung im Haushalt nicht gezielt bei den STEC-Infektionen vorgenommen werden, für die ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines hämolytisch-urämischen Syndroms besteht (vornehmlich O157). Für eine effektivere Surveillance ist es daher notwendig, Testverfahren einzusetzen, die in einem diagnostischen Schritt sowohl den Toxintyp (phäno- oder genotypisch) als auch die relevanten HUS-Serogruppen erfassen.

IV. Management von lebensmittelbedingten Ausbrüchen am Beispiel einer Häufung von EHEC-Erkrankungen nach einem Schulausflug

Markus Kirchner¹, Cornelia Dildei², Martin Runge³, Asmien Brix³, Katja Claussen¹, Ulrike Weiss⁴, Angelika Fruth⁵, Alexander Mellmann⁶, Lothar Beutin⁷, Angelika Miko⁷, Heidi Wichmann-Schauer⁸, Matthias Pulz¹, Johannes Dreesman¹

¹Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (NLGA), Hannover

²Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Verbraucherschutz und Landesentwicklung (ML), vormals ³

³Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) – Veterinärinstitut Hannover

⁴Landkreis Diepholz - Gesundheitsamt

⁵Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Wernigerode

⁶Konsiliarlabor für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS) am Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

⁷Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

⁸FGr. 44 Prävention und Aufklärung lebensmittelbedingter Ausbrüche, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

Keywords: EHEC, O157:H7, HUS, Ausbruch, Rohmilch

Hintergrund: Im Anschluss an einen Tagesausflug einer Grundschule auf einen Bauernhof im Mai 2008 erkrankten von 109 Teilnehmern (101 Schüler und 8 Lehrkräfte) 45 Teilnehmer im Alter zwischen 6 und 10 Jahren an Symptomen einer akuten Gastroenteritis (Attack rate 41%). Zwei Kinder mussten mit einem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) stationär behandelt werden.

Methodik: Im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie wurden alle Teilnehmer nach Symptomen und ihrem Lebensmittelverzehr während des Ausflugs befragt. Von allen Teilnehmern sowie von den Angehörigen erkrankter Personen wurden Stuhlproben auf Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) und weitere Darmbakterien untersucht. Bei positivem PCR-Befund für EHEC erfolgte die Anzucht des Erregers zur weiteren Feintypisierung. Die Veterinärbehörden untersuchten Tankmilchproben und Kotproben der Kühe des Bauernhofs auf EHEC und andere pathogene Erreger.

Ergebnisse: Für die Auswertung standen von allen Teilnehmern des Ausflugs Fragebögen und Stuhlproben zur Verfügung. Bei 26 Teilnehmern (Attack rate 24%) konnte EHEC O157:H7 nachgewiesen werden. Darunter waren auch die beiden Kinder mit HUS. Von den im Fragebogen abgefragten Expositionen wies in der logistischen Regression nur der Verzehr von Rohmilch ein signifikant erhöhtes Risiko (OR=8,82, p=0,04) für eine EHEC-Infektion auf. In den Kotproben der Rinder wurden verschiedene EHEC gefunden, am häufigsten EHEC O157:H7 (7 von 25 Isolaten). Ein Stammvergleich von ausgewählten EHEC O157:H7 Isolaten aus humanen Stuhlproben von laborbestätigten Fällen und aus Rinderkotproben zeigte ein identisches Muster in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).

Schlussfolgerung: Auch wenn der Ausbruchserreger in den untersuchten Tankmilchproben nicht nachweisbar war, kann der Verzehr von Rohmilch auf dem Bauernhof aufgrund der epidemiologischen Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit als Infektionsquelle angesehen werden. Die mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse einschließlich der durchgeführten Stammvergleiche unterstützen die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchung. Rohmilch ist als Infektionsquelle für EHEC-Infektionen bekannt [1, 2]. Der Ausbruch hätte sich durch ein Erhitzen der Rohmilch oder durch Abgabe von pasteurisierter Milch verhindern lassen. Schnelles Handeln und enge Kooperation mit allen Beteiligten hat zur Aufklärung der Ausbruchsursache maßgeblich beigetragen.

Literatur:

[1] Allerberger F, et al. Escherichia coli O157 infections and unpasteurized milk. Euro Surveillance 2001; 16:147-151.

[2] Crump JA, et al. An outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. New England Journal of Medicine 2002; 347:555-560.

V. Molekulare Epidemiologie enterohämorrhagischer *Escherichia coli* O157 in Deutschland im Zeitraum von 1987 bis 2008

Christian Jenke¹, Dag Harmsen², Thomas Weniger², Andrea Lagemann¹, Martina Bielaszewska¹, Eija Hyytiä-Trees³, Helge Karch¹ und Alexander Mellmann¹

¹Institut für Hygiene, Konsiliarlabor für Hämolytisch Urämisches Syndrom, Universitätsklinikum Münster

²Poliklinik für Parodontologie, Universitätsklinikum Münster

³Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

Keywords: EHEC O157, epidemiology, phylogeny, MLVA, typing

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) O157 gehören zu den Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC), die eine wässrige/blutige Diarrhö und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen können. Mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurden in der Vergangenheit zeitlich begrenzte epidemiologische Untersuchungen, z. B. im Rahmen von Ausbrüchen, von EHEC O157 durchgeführt. Die molekulare Epidemiologie von EHEC O157 über einen Zeitraum von mehreren Jahren ist dagegen in Deutschland bislang nicht untersucht worden, und es gibt demzufolge keine Daten zu Langzeitstudien. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine EHEC O157-Kollektion aus einem Zeitraum von mehr als 20 Jahren mithilfe der Multiple-locus variable-number tandem-repeats (VNTR) analysis (MLVA) analysiert, um die molekulare Epidemiologie dieser Erreger für die genannte Zeitspanne aufzuklären.

Hierzu wurden bis zu 17 epidemiologisch nicht verwandte humane EHEC O157-Isolate pro Jahr für das Zeitintervall von 1987 bis 2008 aus der Stammsammlung des Institutes für Hygiene (Münster) ausgewählt. Alle Stämme wurden unter Zuhilfenahme des aktuellen MLVA O157 PulseNet-Protokolls der Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA, USA) analysiert. Die phylogenetische Charakterisierung erfolgte mithilfe der Ridom SeqSphere Software Version 0.9 beta (Ridom GmbH, Würzburg). MLVA-Profilen mit maximal zwei VNTR-loci-Unterschied wurden zusammen gruppiert und als nah verwandt eingestuft.

Insgesamt wurden bei den 202 Stämmen 141 verschiedene MLVA-Profile ermittelt. Hierbei betrug der Index of Diversity 0,98. Die Bestimmung der VNTR-locusspezifischen Biodiversität ergab Indexwerte von 0,66 bis 0,9, wobei 6 bis 22 verschiedene Allele identifiziert werden konnten. Bei 4 von 8 untersuchten VNTR-loci wurden für 48,5% aller Stämme Nullallele nachgewiesen, d. h. es war entweder kein Amplifikat vorhanden oder lange Fragmente lagen aufgrund von Insertionen weit außerhalb des analysierten Bereiches. Die phylogenetische Analyse ergab eine Gruppierung von insgesamt 67,3% aller Stämme in 19 Cluster, die jeweils 2 bis 61 Stämme umfassten. Das größte Cluster enthielt ausschließlich alle 61 Sorbitol-fermentierenden (SF) EHEC O157:H⁻-Stämme, die in einem Zeitraum von über 20 Jahren von Patienten isoliert wurden, was auf eine erfolgreiche Ausbreitung dieses Erregerklons hindeutet. Zusammengefasst konnten mit dieser Studie erstmals Daten zur molekularen Epidemiologie und Phylogenie von EHEC O157 über mehr als zwei Jahrzehnte erhoben werden, die die erfolgreiche Persistenz einzelner Klone über viele Jahre beweisen.

VI.

Langzeitfolgen des EHEC assoziierten HUS: Todesfälle, chronische Niereninsuffizienz und Nierentransplantation

A Rosales¹, J Hofer¹, P Pedevilla¹, M Riedl¹, E Tengg¹, TC Jungrathmayr¹, R Würzner²,
A Gerber³, H Fehrenbach⁴, K Werber⁵, A Strasak⁶, H Karch⁷, LB Zimmerhackl¹.

¹ Department of pediatrics, Medical University of Innsbruck, Austria; ² Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Austria; ³ Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Universität Freiburg, Germany; ⁴ Kinderklinik Memmingen, Memmingen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, Berlin Germany; ⁶ Department für Medizinische Statistik, Informatik und Gesundheitsökonomie, Medizinische Universität Innsbruck; ⁷ Institut für Hygiene, Universität Münster, Germany.

Hemolytic uremic syndrome represents the main cause of acute renal failure in children. The major cause of HUS in children is a potentially preventable food borne infection with Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC).

From January 1st 1997 to December 31st 2002, 628 patients <21 years of age with the clinical diagnosis of HUS were registered in a prospective multicenter study in Austria and Germany. This prospective multicenter study was performed to evaluate the long term clinical course, the correlation between risk factors in the acute phase, long term outcome of HUS and the different characteristics between the STEC positive and STEC negative HUS.

The need of dialysis for a longer period in the acute phase correlated to the presence of hypertension ($p < 0.03$) and constricted kidney function ($p < 0.03$) in the follow-up period. Patients < one year at onset were at a higher risk to present renal impairment after discharge (OR 31.2; CI 3.4-281) A higher incidence of post-discharge sequelae was observed in patients with hypertension in the acute phase ($p < 0.02$).

HUS is a critical disease not only in the acute phase. Disease progression should be noted as critical too, underlining the importance of long-term follow up.

VII.**O26 assoziiertes HUS: akute Präsentation und Langzeitverlauf der Erkrankung**

*Rosales Alejandra*¹, Moser Christine¹, Riedl Magdalena¹, Pedevilla Pamela¹, Giner Thomas¹, Würzner Reinhard², Karch Helge³, Jungraithmayr Therese¹, Hofer Johannes¹, Zimmerhackl Lothar Bernd¹.

¹ Department für Pädiatrie I, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich.

² Institut für Hygiene and Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich

³ Institut für Hygiene, Universität Münster, Münster, Deutschland.

Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) ist die häufigste Ursache von Niereninsuffizienz im Kindesalter, zumeist wird dies durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) ausgelöst.

628 Patienten unter 21 Jahren mit der Diagnose HUS wurden von Januar 1997 bis Dezember 2002 in Österreich und Deutschland in eine prospektive Multicenter Studie eingeschlossen. Ein Ziel dieser Studie war, den Zusammenhang zwischen den verschiedenen EHEC Serotypen und dem Verlauf der Erkrankung besser zu verstehen.

EHEC O26: H11 war der zweithäufigst isolierte Serotyp (15,4% aller EHEC-Isolate). Das Medianalter war mit 1,41 Jahre bei Erkrankungsbeginn in der O26 Gruppe deutlich niedriger als bei den anderen Serotypen ($p < 0,001$). Ein schwerer Verlauf der Erkrankung in dieser Altersgruppe wurde bereits beschrieben, jedoch konnte die Frage ob primär das Alter (< 1 . Lebensjahr) oder der Serotyp den schweren Verlauf der Erkrankung verursachen nicht geklärt werden. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich in der klinischen Präsentation von Patienten mit EHEC O26 assoziiertem HUS im Vergleich zu anderen Serotypen kein signifikanter Unterschied.

Unsere Studie unterstreicht die Bedeutung von anderen EHEC Serotypen neben O157:H7 in der Ätiologie des HUS und betont die Notwendigkeit entsprechender diagnostischer Methoden um das gesamte Spektrum der mit HUS assoziierten EHEC Serotypen abzudecken.

B

Abstracts – Nachweisverfahren und Diagnostik

- I. Untersuchungen zur Spezifität eines immun-chromatografischen Schnelltests zum Nachweis von Shigatoxinen und des *E. coli* O157 Antigens
L. Beutin et al., Berlin
- II. Hochsensitiver Nachweis unterscheidlicher Antigene in Untersuchungsproben durch die Immuno-PCR Technik
T. Kuczius et al., Münster
- III. Entwicklung neuer Phagenproteine zur verbesserten Detektion von sechs nicht-O157 EHEC Serotypen
S. Leopoldseder et al., München

I.

Untersuchungen zur Spezifität eines immun-chromatografischen Schnelltests zum Nachweis von Shigatoxinen und des *E. coli* O157 Antigen

Lothar Beutin, Katja Steege und Ylanna Burgos

Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* (NRL-E.coli), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

Die Identifizierung von Shiga Toxin bildenden *E. coli* (STEC) aus Lebensmitteln und anderem Untersuchungsmaterial ist nicht unproblematisch. Einerseits, weil STEC sich phänotypisch nicht von anderen *E. coli* unterscheiden, andererseits, weil die von den STEC gebildeten Shiga Toxine (Stx) sich hinsichtlich ihrer gebildeten Menge und Eigenschaften stark unterscheiden können. Zum Nachweis von Shiga-Toxinen (Stx) existieren genetische, zytologische und immunologische Verfahren. Für die Routinediagnostik werden häufig im Handel vertriebene Testsysteme verwendet, da diese standardisiert sind und keine besonderen Geräte und Kenntnisse bei den Anwendern erfordern. Für den Stx Nachweis stehen hierbei Enzym-Immunoassays (EIA) im Vordergrund. Eine neuere Entwicklung stellen immun-chromatografische Schnelltests dar, die ohne apparativen Aufwand in 15 Minuten eine Aussage in Form eines farbigen Präzipitats auf einem Teststreifen ergeben. Zum Vergleich beider Systeme haben wir einen bereits evaluierten Enzymimmunoassay (RIDASCREEN®ELISA) (1) mit einem neu entwickelten Immun-chromatografischen Schnelltest (RIDA®QUICK Verotoxin/O157) auf ihre Sensitivität und Spezifität verglichen. Beide Testverfahren zeigten ähnliche Ergebnisse beim Stx Nachweis. Alle Toxine der Stx1 Familie (Stx, Stx1, Stx1c & Stx1d) wurden mit beiden Systemen erkannt. Von den sieben Toxintypen der Stx2 Familie wurden Toxine aus den Gruppen Stx2a, Stx2b, Stx2c und Stx2d gut erkannt. Negative bzw. fragliche Ergebnisse wurden für Toxine der Gruppen Stx2e, Stx2f und Stx2g erzielt. Somit konnten mit beiden Testverfahren die humanpathogenetisch bedeutsamsten Shiga Toxine gut bis sehr gut identifiziert werden.

Wichtige Faktoren, die bei der Verwendung von serologischen Nachweisverfahren für Shiga-Toxine eine Rolle spielen sind die Induktion der Toxinbildung und das verwendete Induktionsmedium in dem die Bakterien angezüchtet werden. Diese Faktoren müssen optimiert werden, um bei Anreicherungskulturen aus Lebensmitteln und anderen Proben, bei denen Mischkulturen mit STEC und anderen Bakterien vorliegen, ein ausreichendes Testergebnis zu erzielen (2).

Ein zusätzlicher Vorteil des RIDA®QUICK Verotoxin/O157 Tests liegt in der gleichzeitigen Detektion des *E. coli* O157 Antigens. Mit dem Test konnten *E. coli* O157 Stämme, unabhängig davon ob sie Stx bilden oder nicht, deutlich erkannt werden. Die Erkennung von *E. coli* O157 in Lebensmitteln kann problematisch sein, besonders wenn Mischkulturen mit anderen STEC vorliegen (2). Die Eignung des RIDA®QUICK Verotoxin/O157 Tests zur Untersuchung von Lebensmittel- und anderen Proben auf STEC und *E. coli* O157 muss noch evaluiert werden.

1) Beutin L, et al. Comparative evaluation of the Ridascreen((R)) Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. J Appl Microbiol. 2007 Mar;102(3):630-9.

2) Beutin L. et al. Ergebnisse, Schlussfolgerungen und Empfehlungen aus zwei Ringversuchen zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga (Vero) Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) aus Hackfleischproben, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 5 (1) 21-34, Februar 2010

II. Untersuchungen zur Spezifität eines immun- chromatografischen Schnelltests zum Nachweis von Shigatoxinen und des *E. coli* O157 Antigenen

Thorsten Kuczius, Olga Böhler, Wenlan Zhang und Helge Karch

Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

Keywords: Antigen, Immuno-PCR, Indikatorprotein, Multiplexanalyse, Signal-Verstärkung

Die sensitive Diagnostik von bakteriellen Erregern und Toxinen sowie der Nachweis von Kontaminationen durch Verarbeitungsprozesse in Lebensmitteln gewinnen immer mehr an Bedeutung im Rahmen der Sicherheit der Verbraucher. Bei den gegenwärtig kommerziell verfügbaren und evaluierten Nachweisverfahren werden die Antigene qualitativ nachgewiesen, jedoch sind Sensitivität und Spezifität die limitierenden Faktoren der Systeme.

Daher gibt es großen Bedarf, neue und sensitivere Nachweisverfahren zu etablieren, um geringste Mengen an Antigenen in Untersuchungsproben detektieren zu können. Eine sensitive und spezifische Nachweisteknik bietet die Immuno-PCR (Immuno-Polymerase-Ketten-Reaktion). Sie besteht aus einer Kombination der konventionellen Antikörper basierten EIA-Methode und der PCR-Technik. Antigene in EIA-Platten werden in einer immunologischen Reaktion mittels spezifischer Antikörper detektiert, und an den Immunokomplex wird ein DNA-Fragment gebunden, das im Rahmen einer PCR-Reaktion amplifiziert wird. Das erhaltene PCR Produkt korreliert mit dem Antigenesignal, ist jedoch im Vergleich zum EIA drastisch verstärkt. Mittels Immuno-PCR wurde eine Expression des Toxins Stx1 auch bei genotypisch *stx*₁-positiven STEC-*E.coli*-Stämmen nachgewiesen, bei denen im kommerziellen EIA kein Signal erzielt wurde. Weiterhin wurde in Fleisch- und Wurstproben das saure Gliafaserprotein (GFAP), ein Indikatorprotein des Zentralen Nervensystems (ZNS), nach artifizieller Kontamination mit Gehirnmaterial mit einer bis zu 1.000-fachen Signalverstärkung im Vergleich zum EIA-System bestimmt. Die Immuno-PCR-Technik wurde weiterhin für eine gleichzeitige Multiplexdetektion mehrerer Antigene wie die Neuronen spezifische Enolase, das physiologische Prion Protein und die GFAP in einer Lebensmittelprobe entwickelt. Nach Weiterentwicklung und Evaluierung der hochsensitiven Methodik empfiehlt sich der Einsatz zum Nachweis von Shiga Toxinen und deren Varianten aus Stuhlproben und Lebensmitteln im Rahmen einer sehr sensitiven STEC-Diagnostik. Mit einer jeweils von der Antigen-Antikörper abhängigen Affinität ist eine 10²-10³-fache Signalverstärkung im Vergleich zum EIA erreichbar. Auf diese Weise ist die Methode zur frühzeitigen Diagnostik von Krankheiten und zum Nachweis von Kontaminationen in Lebensmittel- und medizinischen Produkten einsetzbar, und neue Indikatorproteine und Toxine können mit ihrer Hilfe sehr sensitiv identifiziert werden.

III.

Entwicklung neuer Phagenproteine zur verbesserten Detektion von sechs nicht-O157 EHEC Serotypen

Dr. Sonja Leopoldseder¹; Dr. Julia Kaps¹, Karolina Heed²,

¹ Max von Pettenkofer Institut, LMU München, Deutschland

² Hyglos GmbH, Regensburg, Deutschland

Keywords: Bakteriophage; Schwanzfaserprotein; EHEC; Lipopolysaccharid

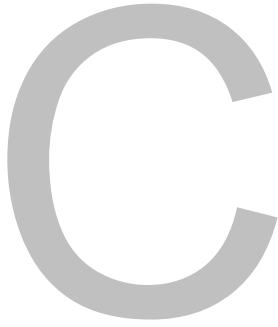
Hintergrund: Antikörper-basierte Assays wie der *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) sind in der Detektion von Lebensmittelkeimen weit verbreitet. Antikörper können jedoch Kreuzreaktionen aufweisen und unspezifische Bindung kann zu falsch-positiven Reaktionen führen. Für den klinisch besonders relevanten O157:H7 konnte, basierend auf einem Phagenprotein, ein hoch spezifisches Detektionsmolekül entwickelt werden [1]. Analoge Bindeproteine wurden nun für die sechs wichtigen Serotypen O111, O26, O103, O145, O121 und O45 entwickelt.

Methoden: Um spezifische und affine Bindeproteine zu erhalten, müssen die Phagenmoleküle isoliert, modifiziert und entsprechend der Anwendung angepasst werden. Eine gezielte Prozessoptimierung führte hier zu einer schnellen und zuverlässigen Methode zur Produktion von serotyp-spezifischen Detektionsmolekülen mit einer mindestens gleichwertigen Funktionalität wie entsprechende Antikörper.

Ergebnisse: Für die erhaltenen Bindemoleküle für O111, O26, O103 und O45 konnte bereits eine sehr gute Capture Effizienz von lebenden Zellen gezeigt werden. Die Wiederfindungsrate liegt auch bei niedrigen eingesetzten Zellzahlen bei nahezu 100 %, wobei die optimale Proteinkonzentration unter 0,02 mg/ml liegt. Auch in der Detektion zeigten Sie gleichwertige oder bessere Sensitivität bei weniger Hintergrundsignal wie entsprechende Antikörper. Die Spezifität wurde an 43 verschiedenen Serotypen von *E. coli* sowie 33 nicht-*E. coli* Stämmen (einschließlich anderer *Enterobacteriae*) gezeigt.

Fazit: Bakteriophagen-basierte Detektionsmoleküle stellen eine sehr gute Alternative zu Antikörpern dar, wie bereits durch die industrielle Anwendung des O157 Bindemoleküls gezeigt werden konnte [1]. Unsere Methode führt zu hoch spezifischen Proteinen, die eine Verbesserung bestehender Tests erlauben und außerdem eine zuverlässige Bestimmung des Serotyps ermöglichen.

¹ Rozand C, Feng PC. Specificity analysis of a novel phage-derived ligand in an enzyme-linked fluorescent assay for the detection of Escherichia coli O157:H7. *Journal of Food Protection* 2009; 72 (5): 1078-1081.



Abstracts – EHEC und Lebensmittel

- I. Ergeben die Eigenschaften von STEC aus tierischen Lebensmitteln Hinweise auf die mögliche Kontaminationsquelle?
A. Martin et al., Berlin
- II. Rückverfolgung lebensmittelassoziierter EHEC-Infektionen, Möglichkeiten der Veterinärbehörden
G. Schleuter, Oldenburg
- III. Nachweis sowie rechtliche Beurteilung von STEC/VTEC in pflanzlichen Lebensmitteln
U. Messelhäuser et al., Oberschleißheim

I.

Ergeben die Eigenschaften von STEC aus tierischen Lebensmitteln Hinweise auf die mögliche Kontaminationsquelle?

Lothar Beutin¹, Annett Martin²

¹Nationales Referenzlabor für Escherichia coli (NRL-E.coli), ²Epidemiologie, Biometrie und mathematische Modellierung, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

Kontaminierte tierische Lebensmittel gelten als Hauptinfektionsquelle für STEC Infektionen des Menschen. Da Lebensmittel an verschiedenen Stationen der Produktion 'from farm to fork' mit STEC kontaminiert werden können, ist die Ermittlung der Eintragsquelle von entscheidender Bedeutung für Präventionsmaßnahmen (HACCP Prinzip). Die Erzeugertiere sind häufig mit STEC kolonisiert, die bestimmte, mit der Tierspezies assoziierte Virulenzmerkmale und Serotypen ausprägen. Es sollte durch univariate und multivariate Analysen nachgewiesen werden, ob diese Merkmale auch bei Lebensmitteln zu finden sind, die von diesen Erzeugertieren stammen. In unseren Untersuchungen analysierten wir 593 STEC aus Lebensmitteln tierischer Herkunft die zu 210 Serotypen gehörten. Es wurden 7 Lebensmittelkategorien definiert: 1. Milch-(produkte) vom Rind (n=131), 2. Fleisch-(produkte) vom Rind (n=171), 3. Fleisch-(produkte) vom Hausschwein (n=83), 4. Fleisch-(produkte) vom Wildschwein (n=37), 5. Fleisch-(produkte) vom Rotwild (n=117), 6. Hasenfleisch (n=21), 7. Milch- und Fleisch-(produkte) von Ziegen und Schafen (n=33). In allen Fällen lagen vollständige Angaben zu den STEC-Serotypen (N= 210), den Shiga-Toxin (Stx) Genotypen, sowie zu den Virulenzgenen für Intimin (eae) und für Entero (EHEC)-Hämolysin (Ehly) vor.

Ergebnisse: Die humanpathogenetisch bedeutsamen Toxine Stx1 und Stx2 sind signifikant häufiger bei Produkten vom Rind und bei Hasenfleisch zu finden ($p < 0,001$). Die häufigsten STEC-Serotypen bei Fleischprodukten vom Rind sind O113:H21, O22:H8, O174:H21 und O178:H19 sowie O2:H27, O171:H25 und O91:H21 bei Milch- und Milchprodukten vom Rind. STEC dieser Serotypen wurden auch häufig im Kot von Rindern nachgewiesen. STEC aus Fleisch von Haus- und Wildschweinen waren signifikant häufiger Stx2e positiv ($p < 0,001$) und sind mit den STEC Serotypen O8:H9, O100:NM und ONT:H19 assoziiert. Diese Serotypen sind auch häufig bei STEC aus Kotproben von Hausschweinen. Toxine der Gruppen Stx1c und Stx2b wurden signifikant häufiger ($p < 0,001$) bei STEC aus Fleisch von Rotwild, sowie bei Lebensmitteln von Ziege / Schaf nachgewiesen. Als Serotypen standen bei Fleisch vom Rotwild STEC O21:H21, O146:H28 und O146:H21 sowie bei Milch- und Fleisch-(produkten) von Ziegen und Schafen O128:H2 und O76:H19 im Vordergrund. STEC O128:H2 wurde oft aus Kot von Schafen und Ziegen und O21:H21 und O146:H28 aus dem Kot vom Rotwild isoliert.

Schlussfolgerungen: Da für die einzelnen Lebensmittelkategorien überwiegend die für die jeweilige Erzeugertierspezies typischen STEC gefunden wurden, wird angenommen, dass die Kontamination der Lebensmittel in der Hauptsache auf das Erzeugertier (Schlachten, Melken) zurückzuführen ist. Präventionsmaßnahmen zur Vermeidung der Kontamination von tierischen Lebensmitteln mit STEC sollten sich daher auf die primäre Lebensmittelproduktion (Schlachthaus, Milcherzeugung) konzentrieren, um bestmögliche Erfolge zu erzielen.

II. Rückverfolgung lebensmittelassoziierter EHEC-Infektionen, Möglichkeiten der Veterinärbehörden

Gabriele Schleuter

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES),
Veterinärinstitut Oldenburg

Keywords: EHEC, Lebensmittel, Veterinärbehörden

Bei EHEC-Erkrankungen des Menschen wird ermittelt, auf welchem Weg der Erreger aufgenommen wurde. Wenn eine Lebensmittelinfektion vorliegt, wird seitens der Veterinärbehörden die Rückverfolgung in der Lebensmittelkette aufgenommen, einerseits um die Kausalkette zu schließen, andererseits um eventuell noch vorhandene kontaminierte Lebensmittel aus dem Verkehr zu nehmen und zukünftigen Kontaminationen vorzubeugen.

Bei den leicht verderblichen Lebensmitteln wie Rohmilch und frisches Fleisch kommt die Information über das verdächtige Lebensmittel oft so spät, das Lebensmittel selber nicht mehr für Laboruntersuchungen zur Verfügung steht

Bei „Ab Hof“ – Abgaben von Lebensmitteln oder auch bei nachweislich direktem Tierkontakt ist der verdächtige Tierbestand leicht zu ermitteln. Für das Management von EHEC-Ausbrüchen aufgrund des Verzehrs von roher Milch liegt ein Handlungsschema vor (Dildei, 2006), das die Untersuchungen und die interdisziplinäre Zusammenarbeit der Human- und Veterinärbehörden vom Lebensmittel bis in den Tierbestand beschreibt

Bei Infektionen über Fleisch oder Fleischerzeugnisse ist das Auffinden der Erregerquelle deutlich schwieriger. In jedem Einzelfall müssen die Ermittlungen dem Herstellungsgang des Lebensmittel angepasst werden, um Untersuchungsproben zielführend zu entnehmen. Die Rückverfolgbarkeit der Herstellung und des Vertriebes von Lebensmitteln ist durch die Gesetzgebung geregelt und die Veterinärbehörden haben im Rahmen ihrer Überwachungstätigkeit Einsicht in die Dokumentationen der Lebensmittelunternehmer.

In den wenigen Fällen, in denen die Kausalkette geschlossen werden kann, bleibt die Frage nach einer wirkungsvollen Maßnahme im Tierbestand, zumal der Nachweis des Erregers im Tier durch das Verhalten des Erregers als Kommensale des Tieres erschwert wird, und nach der Verhinderung zukünftiger Kontaminationen von Lebensmitteln. Es soll kritisch beleuchtet werden, welche Möglichkeiten die Veterinärbehörden bei der Ermittlung einer EHEC-Infektion durch Lebensmittel tierischer Herkunft haben.

Dildei, C. und Dolzinski, B. (2007) Vorschlag für ein Handlungsschema als Sofortmaßnahme im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes zur einheitlichen Vorgehensweise beim Nachweis von Verotoxin in Vorzugsmilch. J Verbr Lebensm 1, Suppl 2:186–187.

III.

Nachweis sowie rechtliche Beurteilung von STEC/VTEC in pflanzlichen Lebensmitteln

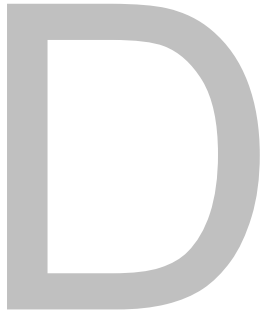
Ute Messelhäuser, Ulla Pudich, Gesine Schulze, Christiane Höller, Ulrich Busch

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststellen
Oberschleißheim und Erlangen

Bei lebensmittelbedingten Ausbrüchen standen im Bezug auf Shiga Toxin-bildende/Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC/VTEC) lange Zeit rohe oder nicht ausreichend durcherhitzte Lebensmittel tierischen Ursprungs (Hackfleisch, Rohfleischerzeugnisse, Rohmilch) im Vordergrund. Nach mehreren großen Ausbrüchen, u .a. ausgelöst durch den Verzehr von rohen Sprossen in Japan sowie rohem Spinat in den USA, rücken inzwischen auch Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs immer mehr in den Fokus der amtlichen Lebensmittelüberwachung.

In diesem Zusammenhang stellt sich immer häufiger die Frage, wie es gerade im Bereich der Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs möglich ist, den Verbraucher unter Berücksichtigung der üblichen Verzehrsgewohnheiten adäquat vor einer EHEC-Infektion zu schützen. Bei frischen, rohen pflanzlichen Lebensmitteln gehen die verantwortlichen Lebensmittelunternehmer zumeist davon aus, dass gründliches Waschen vor dem Verzehr ausreichend ist, um ein sicheres Lebensmittel zu erhalten. Aufgrund der Ergebnisse aus wissenschaftlichen Studien, die u. a. an künstlich kontaminierten Sprossen durchgeführt wurden, lässt sich inzwischen allerdings beweisen, dass die STEC/VTEC-Kontamination nicht nur die Oberfläche, sondern auch das Innere der Sprossen betrifft. Somit ist diese Empfehlung als nicht ausreichend zu beurteilen. Bei getrockneten pflanzlichen Lebensmitteln wie z. B. Tee und –erzeugnissen oder Gewürzen stellt sich häufig das Problem, dass die Kontaminationsraten zum Teil sehr niedrig sind. Hierdurch wird zum einen eine lebensmittelrechtlich belastbare Diagnostik erschwert und, zum anderen das Risiko einer EHEC-Erkrankung eher als gering eingestuft. Im Bereich der amtlichen Überwachung stellt sich somit im Bezug auf Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs immer wieder das Problem, dass die im Bereich der Lebensmittel tierischen Ursprungs inzwischen üblichen Warn- und Sicherheitshinweise bzgl. einer ausreichenden Erhitzung der Produkte keine Akzeptanz finden, da der bestimmungsgemäße Gebrauch bei vielen pflanzlichen Lebensmitteln, z. B. bestimmten Sprossen und Keimlingen, naturgemäß im Rohverzehr liegt.

Das Bayerische Landesamt untersucht seit Jahren eine Vielzahl unterschiedlicher pflanzlicher Lebensmittel auf STEC/VTEC. Untersuchungsdaten aus dem Zeitraum von 2005 – 2010 sowie Beispiele für die rechtliche Beurteilung von Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs werden vorgestellt.



Abstracts – EHEC in Tier und Umwelt

- I. Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen: Forschung stärken – Wissen verknüpfen
G. Benninger et al., Münster
- II. Microarray-basierte Genotypisierung von EHEC O156:H25/H-/Hnt isoliert in deutschen Rinderbeständen und Untersuchungen zu deren räumlichen und zeitlichen Zusammenhängen
L. Geue et al., Wusterhausen
- III. Vorkommen und Eigenschaften von Intimin-kodierenden *E. coli*-Stämmen bei Schweinen in Deutschland
S. Barth et al., Giessen

I.

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen: Forschung stärken – Wissen verknüpfen

Gerlinde Benninger¹, Stephan Ludwig¹, Ilia Semmler², Sebastian C. Semler²,
Anke Wiethölter³, Martin Groschup³

Nationale Forschungsplattform für Zoonosen

¹Universität Münster

²TMF e.V., Berlin

³Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems

Keywords: Zoonosen, vernetzte Forschung, Human- und Veterinärmedizin

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen ist eine wissenschaftsgetriebene, institutionalisierte Dachorganisation, die die Interessen der Zoonosenforscher sowie der zoonotischen Forschungsverbände in Deutschland repräsentiert. Sie vertritt die Interessen von Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern universitärer und außeruniversitärer Forschungseinrichtungen der Zoonosenforschung.

Ziel der Forschungsplattform ist es, ein Netzwerk zu schaffen, das schnell funktionsfähige, flexible und nachhaltige Lösungen für die Erforschung, Prävention und Bekämpfung von zoonotischen Infektionskrankheiten entwickelt und umsetzt.

Ihre Aufgaben bestehen darin,

- themenspezifischer Workshops und Symposien durchzuführen,
- nationale, europäische und internationale Kooperationen zu fördern,
- bereits verfügbare Ressourcen innerhalb der Forschungsplattform zu registrieren, zu dokumentieren und zu standardisieren,
- zoonosen-spezifische Datenbanken zu konzipieren, zu erstellen und zu pflegen,
- neue Verbundförderungen, besonders auf europäischer Ebene, anzubahnen sowie
- Pilot- und Querschnittsprojekten zu initiieren und zu administrieren.

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen vereinigt aktuell 166 Zoonosenforscher unter ihrem Dach. Der interne Beirat mit 12 gewählten und 3 Mitgliedern qua Amt vertritt die Zoonosenplattform nach außen. Ein externer Beirat aus international anerkannten Experten berät die Plattform in ihrer wissenschaftlichen Arbeit sowie strategischen Ausrichtung.

Die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Geschäftsstelle der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen wurde 2009 gegründet und ist an den drei Standorten Berlin (TMF), Münster (Westfälische Wilhelms-Universität) und Insel Riems (FLI) angesiedelt. Die synergistische Nutzung der lokalen Kompetenzen trägt maßgeblich dazu bei, die Forschungsplattform in der Zoonosenforschung dauerhaft zu verankern.

Die Plattform steht allen Wissenschaftlern, die im Bereich Zoonosen in Deutschland forschen, offen. Weitere Informationen finden Sie unter www.zoonosen.net.

II.

Microarray-basierte Genotypisierung von EHEC O156:H25/H-/Hnt isoliert in deutschen Rinderbeständen und Untersuchungen zu deren räumlichen und zeitlichen Zusammenhängen

Lutz Geue¹, Susann Schares¹, Birgit Mintel¹, Franz J. Conraths¹, Elke Müller², Ralf Ehricht²

¹Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie, Wusterhausen

²CLONDIAG GmbH Jena, Jena

Keywords: Microarray, O156, EHEC-Virulenzmarker, Clusteranalyse

E. coli Stämme (n=32), die über einen Zeitraum von 21 Monaten aus drei geographisch getrennten Betrieben isoliert und als O156:H25/H-/Hnt serotypisiert worden waren, wurden mittels Microarray (*E. coli*-Array-Strip, CLONDIAG, Jena) genotypisch charakterisiert. Neben DNA-basierter Genotypisierung und dem Nachweis von EHEC-assoziierten und anderen *E. coli*-Virulenzmarkern ist auch die Detektion von antimikrobiellen Resistenzgenen auf einem Microarray vereint.

Die ursprüngliche Serotypisierung war nicht in allen Fällen konform mit den Ergebnissen der DNA-basierten Serotypisierung, weil nur 25 der 32 Isolate eindeutig als O156:H25 identifiziert werden konnten. Eines der Isolate wurde als O103:H43 typisiert und in den anderen 6 Isolaten war eine Bestimmung der O-Gruppe mit DNA-basierter Serotypisierung nicht möglich. In der MLST-Analyse wurden alle 25 EHEC O156:H25 Isolate als Sequenztypen (ST) 300 (22) und 688 (3) charakterisiert, wobei sich beide STs nur durch einen Nukleotidaustausch im *purA*-Gen unterscheiden. Die übrigen 7 Isolate wurden in verschiedene andere STs eingeordnet.

Mittels der Oligonucleotid-Microarrays lässt sich ein sehr viel breiteres Spektrum an EHEC-assoziierten und anderen *E. coli*-Virulenzmarkern simultan nachweisen, als dies mit anderen Methoden möglich ist. Alle von uns isolierten bovinen EHEC O156:H25 demonstrierten ein weites Spektrum an typischen EHEC Virulenzmarkern. In ihnen waren *stx1*-Gene stets kombiniert mit EHEC-*hlyA* Genen und *eae* (Subtyp ζ) Genen nachweisbar. Zahlreiche andere LEE-encoded und non-LEE-encoded Gene des Typ III Sekretionssystems sowie plasmid-encoded Gene waren vorhanden. Einzelne Gene wurden für *E. coli* der Serogruppe O156 erstmalig nachgewiesen.

Die 32 *E. coli*-Isolate ließen sich in acht verschiedene Clustergruppen einordnen, wobei die EHEC O156:H25 vier Clustergruppen darstellten. Im Unterschied zu O26:H11 [1] waren die O156:H25-Clustergruppen nicht betriebsspezifisch. Die Ergebnisse der Clusteranalyse deuten darauf hin, dass einige O156:H25 Stämme das Potential für eine lange Persistenz in Rinderbeständen besitzen, während andere nur kurzfristig in Erscheinung traten. Mögliche Ursachen werden diskutiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *E. coli* O156:H25 bovinen Ursprungs ein mögliches Risiko für humane Infektionen darstellen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Oligonucleotid-Arrays ein exzellentes Tool für den schnellen Nachweis von Virulenzmarkern darstellt. Zusätzlich gestattet diese Methode sich einen Überblick über die vorhandenen antimikrobiellen Resistenzgene zu verschaffen.

Geue, L.; Klare, S.; Schnick, C.; Mintel, B.; Meyer, K.; Conraths, F. J. (2009). Analysis of the clonal relationship of serotype O26:H11 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:6947-6953.

III.

Vorkommen und Eigenschaften von Intimin-kodierenden *E.coli*-Stämmen bei Schweinen in Deutschland

Stefanie Barth¹, Angelika Fruth², Julia Fröhlich¹, Rolf Bauerfeind¹

¹Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität, Giessen

²Robert Koch-Institut, Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Wernigerode

Keywords: Intimin, Schwein, Adhäsion, Serotypie, EPEC

Intimin ist ein bakterielles Adhäsion, das enteropathogene *E. coli* (EPEC)- und einige Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC)-Stämme kennzeichnet. Intimin spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der von EPEC und STEC verursachten typischen "Attaching and Effacing" (A/E)-Läsionen auf intestinalen Epithelzellen. Über die Bedeutung des Schweines als Reservoir für EPEC und Intimin-bildende STEC liegen nur sporadisch Daten vor [1-3]. Um die bei Schweinen in Deutschland vorkommenden Stämme zu klassifizieren, wurden 2.853 porcine *E. coli*-Isolate zunächst mittels PCR auf das Intimin-Gen (*eae*), und alle *eae*-positiven Isolate dann auf das *bfpA*-Gen, *stx*-Gene, den Intimin-Typ und ihren Serotyp getestet. An repräsentativen Isolaten (n = 11) wurde die Adhäsion an porcine IPEC-J2- und humane HEp-2-Epithelzellen untersucht.

Das *eae*-Gen war bei 117 Isolaten (4 %) von 116 Schweinen (5 %) in 86 Betrieben (12 %) nachweisbar. Zwei Isolate besaßen zudem das *stx1*-Gen (STEC). Nur ein Isolat wurde als typischer EPEC klassifiziert, da er das *bfpA*-Gen besaß. Dagegen 99 % der Isolate erwiesen sich als atypische EPEC (aEPEC), da sie kein *bfpA*-Gen besaßen. Die meisten Stämme kodierten für die Intimin-Typen β 1 (71 Isolate) und γ 2/ θ (25); die Typen ξ , ϵ , γ 1, κ/δ und α 1 kamen seltener vor. Insgesamt wurden 37 verschiedene Serotypen nachgewiesen, wobei Ont:H49 (24 Stämme), Ont:H- (14), O76:H7 (8), Ont:H7 (8), O157:H- (5), Ont:H2 (5), O103:H2 (4), O108:Hnt (4) und O26:H11 (4) am häufigsten vorkamen. Mit Ausnahme der zwei γ 2/ θ -Isolate, induzierten die Vertreter aller Intimin-Typen A/E-Läsionen an den Epithelzellen. Dabei erzeugten 7 Stämme (64 %) Läsionen auf beiden Zelllinien und 2 Stämme (18 %) nur auf IPEC-J2-Zellen.

Nach diesen Ergebnissen kommen Intimin-kodierende *E. coli* bei Schweinen in Deutschland häufig vor und sind phäno- und genotypisch sehr heterogen. Meist sind sie den aEPEC und nur in Einzelfällen den typischen EPEC oder STEC zuzuordnen. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Serotypie, dass das Schwein möglicherweise einen Reservoirwirt für humane aEPEC darstellt.

Literatur:

1. Fröhlicher et al. 2008. BMC Microbiol. 8: 144.
2. Malik et al. 2006. Vet. Microbiol. 114(1-2): 82-93.
3. Vu-Khac et al. 2007. Vet. J. 174(1): 176-187.



Abstracts – Pathogene *E.coli*

- I. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (ATEC) –
lost in translation?
A. Schmidt, Münster
- II. Close relationship between murine atypical enteropathogenic
Escherichia coli (aEPEC) and human aEPEC: are rodent aEPEC
zoonotic pathogens?
L. H. Wieler et al., Berlin
- III. Results from studies on antimicrobial resistant *E. coli* from wildlife
rodents
S. Guenther, Berlin

I. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (ATEC) – lost in translation’?

Daniel Müller, Christoph Buss, Ariane Liebchen, Christian Rüter, Inga Benz, Denise Yamamoto*, Tânia Gomes do Amaral*, Helge Karch#, and M. Alexander Schmidt

Institute of Infectiology (ZMBE)

#Institute of Hygiene – Westfälische Wilhelms-Universität Münster (Germany) and Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brazil

Intestinal pathogenic *Escherichia coli* is an important cause of diarrhoeal diseases in humans and animals ranging in its manifestations from severe to persistent diarrhoea. Pathogenic *E. coli* strains have been grouped according to characteristic profiles of selected virulence factors in at least seven pathotypes. Among these groups the pathogenicity of atypical enteropathogenic *E. coli* (ATEC) has been a matter of debate as ATEC strains can also be found in apparently healthy individuals. However, ATEC have been recognized as emerging pathogens as they have ousted classical EPEC strains in several outbreak investigations. ATEC strains are characterized and identified by the presence of the LEE pathogenicity island in combination with a lack of the EAF plasmid and of Shiga toxin-encoding genes.

To easily identify intestinal pathogenic *E. coli* we have developed a novel one-step multiplex PCR targeting 11 characteristic genes indicative of the currently known pathogroups. Screening our library of *E. coli* isolates as well as the ECOR collection we identified several intermediate strains exhibiting virulence factor profiles in-between the accepted pathogroups. To address this for LEE-harboring strains in further detail we have investigated the LEE and its flanking regions in several human ATEC strains of different serotypes by comparative sequence analysis. As expected, genes encoding the actual T3SS are highly conserved. However, T3SS-dependent effector proteins were found to exhibit substantial variability. The flanking regions were found to be highly divergent which again proved the prototype EPEC strain E2348/69 to represent a remarkable exception. Furthermore, we could identify a novel T3SS effector protein at the 5'-end of the LEE of several diarrhoeal *E. coli* strains that was found to interact with the cellular scaffolding protein IQGAP1 and was termed accordingly 'IQGAP1-binding effector' (Ibe). A survey of EPEC, EHEC, and ATEC isolates showed that Ibe was most frequently found among EHEC strains followed by ATEC isolates and least present in EPEC strains. Taken together with recent reports from other groups this supports the emergence of ATEC strains by loss of prophage-encoded *stx* genes rather than by the loss of the EAF-plasmid. Moreover, as an additional virulence trait of ATEC strains we could recently demonstrate their capacity for invasion of epithelial cells.

II.

Close relationship between murine atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) and human aEPEC: are rodent aEPEC zoonotic pathogens?

Katrin Heidemanns¹, Marcel Nordhoff^{1,2}, Torsten Semmler¹, Erhard Tietze³, Angelika Fruth³, Alexander Mellmann⁴, Mathias Schlegel⁵, Helge Karch⁴, Rainer G. Ulrich⁵,
Lothar H. Wieler¹

¹*Institute of Microbiology and Epizootics, Freie University Berlin, Berlin,*

²*Bundeswehr, Central Institute for Medical Service, Kiel*

³*Robert Koch Institute, Wernigerode Branch, Wernigerode,* ⁴*Institute for Hygiene and the National Consulting Laboratory on Hemolytic Uremic Syndrome, Münster*

⁵*Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Greifswald – Insel Riems*

Keywords: aEPEC, human, rodent, virulence profiles, MLST, serotyping

Schlüsselwörter: aEPEC, Mensch, Nager, Virulenzprofil, MLST, Serotypisierung

To define a possible reservoir function of wild living rodents for Shiga toxin-producing (STEC) or enteropathogenic *E. coli* (EPEC), the occurrence of these pathogens was investigated in fecal specimens of rodents. A total of 180 *E. coli* (12.8%) strains were isolated from 1.400 fecal specimens of wild living rodents. All isolates were screened for virulence genes *stx* (Shiga toxin), *eae* and *escV*, the latter ones being molecular markers for the pathogenicity island Locus of Enterocyte Effacement (LEE). None of the strains harboured *stx* genes, while 10 (5.6%) were characterized as atypical EPEC (aEPEC; *eae*+, *bfp*-, *stx*-).

Serotyping revealed three strains sharing On.t:H6, four strains On.t.:NM and one strain each being O:rough:H-, O179:H31, and O167:H- respectively. Whereas only two strains could be successfully O-typed, each strain could be typed by Multilocus Sequence Typing (MLST), allowing the assignment of four strains to sequence type 28 (ST28), four to ST1094, one to ST1092 and one strain to ST1104. All strains of serotype Ont:H6 belonged to ST28. As this is the first report of aEPEC in wild rodents, we compared these strains with eight aEPEC strains of highly related sequence types (ST) isolated from humans suffering from diarrhea by further testing for virulence-associated genes, i.e., *astA* (toxin), *iha*, *paa* (adhesins), for genes identifying the genomic O Island OI 122 (*pagC*, *sen*, *efa1*, *nleB*), for insertion sites typical for Shiga toxinogenic lambdoid phages as well as for clonal relatedness.

None of the aEPEC harboured genes for the genomic OI 122, while 6 rodent and 5 human isolates harboured *paa* and only three rodent strains contained *astA*. These similarities between rodent aEPEC and human aEPEC show that wild rodents may be a source of infection of diarrheagenic aEPEC.

Interestingly, in all rodent strains potential lambdoid phage insertion sites were intact, envisioning the possibility that these strains can be transduced by *stx*-carrying phages. As the rodent aEPEC serotypes detected are also known for STEC serotypes, rodents may act as carriers of pre-STEC strains. Further studies are needed to deepen our knowledge on the epidemiology of aEPEC and to functionally characterize phage transduction conditions for rodent aEPEC.

III.

Results from studies on antimicrobial resistant *E. coli* from wildlife rodents

Sebastian Guenther^{1*}, Mirjam Grobbel², Astrid Bethe¹, Rainer G. Ulrich², Beatriz Guerra³
Lothar H. Wieler¹ and Christa Ewers¹

¹Institute of Microbiology and Epizootics, Freie Universität Berlin

²Friedrich Löffler Institut, Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Greifswald

³Federal Institute for Risk assessment, NRL for Antimicrobial Resistance, Berlin

Keywords: ESBL, antimicrobial resistance, wildlife hosts

The increasing prevalence of extended-spectrum β -lactamases producing (ESBL) *Escherichia coli* in human medicine and in companion and livestock animals is accompanied by a co-emergence of multiresistant *E. coli* in avian and mammal wildlife species [1]. As wildlife is known to be involved in the transmission of bacteria of human and animal health concern, wildlife animals could likewise contribute to the dissemination of multiresistant bacteria. Addressing the question about how widely multiresistant bacteria have already spread into rural and urban ecosystems would be helpful in assessing this supposed risk.

As rodents are ubiquitously distributed in quite different ecosystems and could likely serve as a link between human-influenced settings and natural areas they appear suitable as sentinel for antimicrobial resistance in different ecosystems. We therefore performed two independent studies within the network "Rodent-borne pathogens" [2]; one with a commensal urban rodent species - the brown rat (*Rattus norvegicus*) and the other with small rodents from agriculturally used farmland and nature preserve areas. Among *E. coli* (n=212) isolated from urban rats we observed a high prevalence of multiresistant isolates (25-30%) including human pandemic B2-O25b-ST131 ESBL strain [3]. Conversely, multiresistant strains could not be recovered from small wild rodents (n=188 *E. coli* isolates) and the prevalence of isolates showing resistance for at least one antimicrobial class was rather low (5.3%). Of note, these isolates with a single resistant phenotype were predominantly collected at sampling sites proximate to livestock breeding indicating a possible transmission between domestic and wildlife animals. In conclusion, wild and commensal rodents, living in close proximity to humans or livestock, might contribute to the spread of antimicrobial resistant *E. coli*, requiring further investigations in the future.

[1] Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, et al. Seagulls of the Berlengas Natural Reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harbouring CTX-M and TEM extended-spectrum β -lactamases. Appl Environ Microbiol 2008; 74:7439-41.

[2] Ulrich RG, Schmidt-Chanasit J, Schlegel M, Jacob J, Pelz HJ, Mertens M, et al. Network "Rodent-borne pathogens" in Germany: longitudinal studies on the geographical distribution and prevalence of hantavirus infections. Parasitol Res 2008; 103: 121-109.

[3] Guenther S, Grobbel M, Beutlich J, Guerra-Roman B, Ulrich RG, Wieler LH, Ewers C Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harboring the CTX-M-9 extended spectrum β -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*); J Antimicrob Chemother 2010; 65(3):582-4.

F

Abstracts – Pathogenitätsfaktoren und Genomics

- I. Neue massenspektrometrische Strategien zur Strukturaufklärung von Glykosphingolipid-Rezeptoren bakterieller Exotoxine
J. Müthing et al., Münster
- II. Komplementaktivierung und Reduktion der Faktor H-Zellschutzfunktion durch Shigatoxin 2
R. Würzner et al., Innsbruck
- III. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5
D. Orth et al., Innsbruck
- IV. Neue Bildgebungsverfahren zur Darstellung der Wirkungsweise von Shiga Toxin 1 und Shiga Toxin 2
A. Bauwens et al., Münster
- V. Clonal diversity of clinical Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O91 isolates
M. Bielaszewska et al., Münster
- VI. Comparison of non sorbitol-fermenting and sorbitol-fermenting EHEC O157:H7/Hnm strains using oligonucleotide microarrays
S. Schlager et al., Graz

I.

Neue massenspektrometrische Strategien zur Strukturaufklärung von Glykosphingolipid-Rezeptoren bakterieller Exotoxine

Johannes Müthing¹, Ute Distler¹, Klaus Dreisewerd² und Helge Karch¹

¹Institut für Hygiene, Universität Münster

²Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Münster

Keywords: Toxine, Cholera toxin, Rezeptoren, IR-MALDI-TOF-MS

Die Adhäsion von bakteriellen Exotoxinen an Glykosphingolipide (GSL) der Plasmamembran von eukaryontischen Zellen stellt bei zahlreichen Infektionsprozessen den Initialschritt zellulärer Schädigungen dar. Der Bindung folgen Internalisierung und Transport des Toxins zu den intrazellulären Wirkorten. Die Pathogenitätsmechanismen des Cholera-Toxins (CT) aus *Vibrio cholerae* und der Shiga-Toxine enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC)-Bakterien sind in den vergangenen Jahren intensiv untersucht worden, wobei aus Sicht des Zellbiologen die subzelluläre Wirkungsweise der Toxine im Vordergrund des Interesses stand. CT und Stx gehören zur Familie der AB₅-Toxine, die aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und einem GSL-spezifischen Pentamer aus fünf identischen B-Untereinheiten bestehen. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Feinstruktur der GSL-Rezeptoren und ihre supramolekulare Organisation in Mikrodomänen der Zellmembran, den sogenannten *lipid rafts*, eine entscheidende Rolle sowohl bei der initialen Adhäsion als auch beim retrograden intrazellulären Transport zahlreicher Toxine spielen. Für CT und Stx konnte gezeigt werden, dass ausschließlich *lipid raft*-assoziierte GSL die Rezeptor-vermittelte Endozytose bewerkstelligen können. Das bedeutet, dass nicht nur das hydrophile Oligosaccharid eines GSLs, sondern auch dessen hydrophober Lipidanker (Ceramid) die Interaktion mit einem Toxin und dessen anschließende Passage innerhalb der Zelle maßgeblich bestimmt. Strukturelle Variationen, z.B. in der Fettsäurekomposition des Gangliosids GM1 (CT-Rezeptor) und von Globotriaosylceramid (Stx-Rezeptor), beeinflussen offenbar den subzellulären Verbleib eines GSL-gebundenen Toxins, was unterschiedliche Sensitivitäten von Rezeptor-tragenden Zellen erklären könnte. Demzufolge besteht ein großes Interesse an Technologien, mit denen die Strukturdetails von GSL-Rezeptoren bakterieller Virulenzfaktoren identifiziert werden können, wobei eine Analytik im Nanogramm-Maßstab für viele Fragestellungen essentiell ist. Eine von uns neu entwickelte Kombinationstechnik bestehend aus der Dünnschichtchromatographie gekoppelt mit der Infrarot Matrix-assistierten Laserdesorptions/Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (IR-MALDI-TOF-MS) stellt einen Meilenstein für die strukturelle Charakterisierung von GSL dar [1]. Das Potential dieser sensitiven Technologie wird anhand von Beispielen zur Identifizierung von CT- und Stx-Rezeptoren gezeigt. Die DC-MS-Strategie erlaubt weitreichende Anwendungen für infektionsbiologische Fragestellungen und wird uns zukünftig helfen, die molekularen Mechanismen von Toxin-Wirtszell-Interaktionen besser zu verstehen und daraus neue Strategien zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten zu entwickeln.

[1] Müthing J, Distler U. Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2009; DOI 10.1002/mas.20253; Epub.

II. Komplementaktivierung und Reduktion der Faktor H- Zellschutzfunktion durch Shigatoxin 2

Dorothea Orth¹, Lothar-Bernd Zimmerhackl² & Reinhard Würzner¹

¹Hygiene & Med. Mikrobiologie, Universität Innsbruck

²Pädiatrie I, Med. Universität Innsbruck

Keywords: EHEC, Komplement, Shigatoxin, Faktor H; EHEC, Complement, Shiga toxin, Factor H

Infektionen mit *Escherichia coli* (EHEC) sind als Hauptursache des typischen Haemolytisch- Urämischen Syndroms (HUS) anzusehen. Shigatoxine und hier besonders Stx2 zählen wohl zu den wichtigsten Virulenzfaktoren. Neben dem EHEC-assoziierten HUS gibt es auch noch angeborene „atypische“ HUS-Formen, welche zumeist durch Mutationen in Komplementregulatorproteinen bedingt sind.

Das Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob Komplement auch in die Pathogenese des EHEC-induzierten „typischen“ HUS involviert ist.

Aufgereinigtes Stx2 aktiviert signifikant den alternativen Weg des Komplementsystems und bindet auch an Faktor H, während hitzeinaktiviertes dazu nicht in der Lage ist. Auf der Zelloberfläche führt diese Bindung zu einer Verzögerung und Verringerung der sogenannten Kofaktorfunktion von Faktor H, einer Schutzfunktion die für die Integrität der Zelle sehr wichtig ist.

Zusammenfassend kann Shigatoxin also einerseits das potentiell zellschädigende Komplementsystem aktivieren und reduziert gleichzeitig auch den Schutz der Zellen.

Damit ist das Komplementsystem auch in die Pathogenese des typischen HUS involviert.

III.

EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5

Dorothea Orth¹, Silvia Ehrlenbach¹, Jens Brockmeyer², Abdul Basit Khan¹, Helge Karch²,
Bettina Sarg³, Herbert Lindner³, Reinhard Würzner¹

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

²Institute for Hygiene and the National Consulting Laboratory on Hemolytic Uremic Syndrome, University of Münster

³Division of Clinical Biochemistry, Biocenter, Innsbruck Medical University

Keywords: EHEC, EspP, Komplement, C3, C5; EHEC, EspP, Complement, C3, C5

Hemolytic uremic syndrome (HUS) is a life-threatening disorder characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia, and renal insufficiency. It is mainly caused by infections with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Recently, Shiga toxin 2, the best studied virulence factor of EHEC, was reported to interact with complement, implying that complement is involved in the pathogenesis of EHEC-induced HUS.

The aim of the present study was to investigate whether or not the serine protease EspP, an important virulence factor of EHEC, interacts with complement proteins.

EspP did not have any effect on the integrity of Factor H or Factor I. However, EspP was shown to cleave purified C3/C3b and C5. Cleavage of the respective complement proteins also occurred in normal human serum as source for C3/C3b or C5 or when the purified complement protein was added to supernatant of an EspP producing wildtype strain. Edman degradation allowed unequivocal mapping of all three main C3b fragments, but not of the three main C5 fragments. Complement activation was significantly down regulated in all three pathways for C5-depleted serum to which C5, preincubated with EspP, was added (whereas C5 preincubated with an EspP mutant was able to fully reconstitute complement activation). This indicates that EspP markedly destroyed the functional activity, as measured by a commercial total complement ELISA (Wieslab®). Down regulation of complement by EspP in vivo may influence colonisation of EHEC bacteria in the gut or disease severity of HUS.

IV. Neue Bildgebungsverfahren zur Darstellung der Wirkungsweise von Shiga Toxin 1 und Shiga Toxin 2

Andreas Bauwens¹, Martina Bielaszewska¹, Björn Kemper², Patrik Langehanenberg², Gert von Bally², Rudolf Reichelt³, Johannes Müthing¹ und Helge Karch¹

¹Institut für Hygiene, Universität Münster

²Center of Biomedical Optics and Photonics, Universität Münster

³Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Münster

Keywords: Shiga Toxine, Endothelzellen, HUS, Digitale Holographische Mikroskopie

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) verursachen nicht-blutige und blutige Durchfallerkrankungen und das lebensbedrohliche hämolytisch-urämische Syndrom (HUS). Dieses wird durch akutes Nierenversagen, hämolytische Anämie und Thrombozytopenie hervorgerufen. Als Hauptverursacher der dem HUS zugrunde liegenden Schädigung der renalen und cerebralen Endothelzellen gelten die Shiga Toxine (Stx). Sie bestehen aus einer A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten. Die enzymatisch aktive A-Untereinheit wirkt als rRNA-*N*-Glykosidase Ribosomen-inaktivierend im Zytosol, während die Lektin-vermittelte Bindung durch die pentamere B-Untereinheit des Holotoxins an die Glykosphingolipid-Rezeptoren der Zielzellen erfolgt. Über die der Zellschädigung zugrunde liegenden spezifischen Mechanismen ist bislang noch sehr wenig bekannt. Daher haben wir eine Imaging-Methode basierend auf Digitaler Holographischer Mikroskopie etabliert, um Endothelzelllinien nach Kontakt mit Stx1 oder Stx2 einer Einzelzell-Analyse zu unterziehen. Bei der Holographie interferiert das durch die Zellen gestreute Licht mit dem Referenzlicht und es entsteht ein Interferenzmuster (Hologramm), das aufgezeichnet werden kann. Diese markerfreie und nicht invasive Untersuchungsmethode erlaubt es, morphologische Veränderungen einzelner Endothelzellen über einen Zeitraum von 80 Stunden zu verfolgen. Die Exposition von Stx1 verursachte bei mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen eine Nekrose. Bei Experimenten mit Stx2 konnte keine Nekrose beobachtet werden, allerdings auch keine Zellteilung. Diese Teilungsinaktivität beruht auf der apoptotischen Wirkung von Stx2, da ein Zellzyklusarrest mittels Durchflusszytometrie ausgeschlossen werden konnte. DNA-Fragmentierungsassays zur Nekrose- bzw. Apoptosebestimmung bestätigten die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen und die Effekte konnten konzentrationsabhängig quantifiziert werden. Da diese differentiellen Mechanismen von Stx1 und Stx2 nicht auf die bisher beschriebenen Wirkungsweisen von Stx zurückzuführen sind, muss angenommen werden, dass hier ein oder mehrere bisher unbeschriebene Mechanismen eine Rolle spielen.

V. Clonal diversity of clinical Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O91 isolates

Martina Bielaszewska¹, Alexander Mellmann¹, Franziska Stoewe¹, Angelika Fruth²,
Alexander W. Friedrich¹, Wenlan Zhang¹, and Helge Karch¹

¹Institute of Hygiene, University of Münster, Münster, Germany

²National Reference Centre for Salmonella and Other Enteric Pathogens, Robert Koch-Institut, Wernigerode

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O91 – clonal structure – disease association – virulence loci

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to serogroup O91 are the most frequent *eae*-negative STEC causing human disease. We characterized, genotypically and phylogenetically, 100 STEC O91 isolated from patients with hemolytic uremic syndrome (HUS), diarrhea or asymptomatic carriers in order to determine the clonal structure of these pathogens and the association of the particular clones with specific clinical outcomes. Classical and molecular serotyping (*fliC*-typing) demonstrated that the strains belong to four different H types including H8, H10, H14, and H21. These serotypes differed by *stx* genotypes and by combinations of non-*stx* virulence loci including those encoding toxins (*cdt-V*), serine proteases (*espP*), and adhesins (*saa*). In particular, *stx*_{2d-activatable} encoding mucus- and elastase-activatable Stx_{2d}, and *cdt-V* encoding cytolethal distending toxin V, a cyclomodulin causing G2 arrest in microvascular endothelial cells, were solely present in STEC O91:H21. In multilocus sequence typing (MLST) strains of the four different flagellar types were assigned to distinct sequence types (STs). Only infection with STEC strains of serotype O91:H21 and ST422 was significantly ($P = 0.0006$) associated with the development of HUS in the infected persons, whereas strains of the other serotypes mostly originated in patients with non-bloody diarrhea or asymptomatic carriers. We conclude that STEC O91 clinical isolates belong to at least four lineages that differ by H antigens/*fliC* types, *stx* genotypes and non-*stx* putative virulence factors, with accumulation of virulence determinants in the O91:H21 lineage. Our data provide a basis for subtyping of STEC O91 isolates in clinical and epidemiological studies, which enables the assessment of the risk of a severe clinical outcome including HUS in infected individuals. Finally, the presence of the EHEC-*hlyA* gene and expression of the corresponding hemolytic phenotype on enterohemolysin agar by most of STEC O91 isolates, regardless of their serotype, facilitates the isolation of these pathogens from human stool samples.

VI. Comparison of non sorbitol-fermenting and sorbitol-fermenting EHEC O157:H7/Hnm strains using oligonucleotide microarrays

Tanja Stanek^{1,2}, Burkhard Springer¹, Sabine Schlager¹

1 National Reference Center for *Escherichia coli* including VTEC, Institute for Medical Medicine and Hygiene, AGES, Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

2 University of Applied Sciences Joanneum Graz, Biomedical Sciences

Key words: NSF, SF, EHEC, virulence genes, microarrays

Schlüsselwörter: NSF, SF, EHEC; Virulenzgene, Microarrays

Non-sorbitol-fermenting (NSF) enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7, is the most common EHEC associated with diarrhea, hemorrhagic colitis (HC) and the hemolytic uremic syndrome (HUS) worldwide. In 1988, unusual sorbitol-fermenting (SF) EHEC O157:H⁻ (non-motile) were first discovered in Germany during an outbreak of HUS and have emerged as causes of human disease in Europe [1]. The emergence of these SF O157:H⁻ strains is of a great concern since they appear to be associated with a significantly higher incidence of HUS compared to the more common NSF O157:H7/H⁻ strains. Important from the diagnostic point of view is the fact that SF O157:H⁻ strains are missed by procedures commonly recommended for the detection of NSF EHEC O157:H7/H⁻ [1].

Currently employed diagnostic assays, including geno- and phenotypic tests for the detection of virulence genes and their products, have the common drawback of screening only a relatively small number of determinants simultaneously. DNA microarrays offer a viable alternative due to their ability to screen multiple markers simultaneously to determine the genetic and virulence profiles of a single strain or to distinguish one strain from others.

We analyzed 40 (20 SF *E. coli* O157:H⁻, 20 NSF *E. coli* O157:H7/H⁻) clinical isolates using commercially available oligonucleotide based microtube DNA microarrays (Identibac Ec Array Tubes™) [2]. Analysis was concentrated on *stx*, *eae* and EHEC-*hlyA* and on genes which are described to distinguish SF from NSF *E. coli* O157 strains [1].

Concerning *stx*, *eae* and EHEC-*hlyA* our findings did perfectly match previous observations. We analyzed further the presence of *cdtB* (95% positive in SF, 10% positive in NSF), *katP* (5% positive in SF, 100% positive in NSF), *toxB* (0% positive in SF, 100% positive in NSF) and *espP* (10% positive in SF, 100% positive in NSF). Additionally, we found different results in the presence of *astA* (100% positive in SF, 45% positive in NSF), *efa1* (100% positive in SF, 0% positive in NSF), and *iha* (5% positive in SF, 95% positive in NSF).

1. Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 2043-2049
2. Anjum MF, Mafura M, Slickers P, Ballmer K, Kuhnert P, Woodward MJ, Ehrlich R. Pathotyping *Escherichia coli* by using miniaturized DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73: 5692-5697

G

Abstracts – Poster

Epidemiologie und Klinik

- I. Phenotypic and genotypic characterization of human clinical O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated between 2000 and 2009 in Switzerland
U. Käppeli et al., Zürich
- II. Multilocus sequence types and further characteristics of sorbitol-fermenting *E. coli* O157:nonH7 isolates from cattle, pig and sheep
R. Stephan et al., Zürich
- III. Risikofaktoren für Langzeitprobleme des EHEC assoziierten HUS
A. Rosales et al., Innsbruck
- IV. Zur Möglichkeit einer pharmakologischen Eradikation bei Dauerausscheidern von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)
F. Wiedemann et al., Oberschleißheim

Nachweisverfahren und Diagnostik

- V. Phagenligand-basierende selektive Voranreicherung (AMS) für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 nach DIN 10167 sowie für den Nachweis mittels Real-time PCR
M. Schütz et al., Regensburg
- VI. Simultaner Nachweis von EHEC und EPEC Isolaten mit Multiplex Real-Time PCR
M. Pavlovic et al., Oberschleißheim

EHEC und Lebensmittel

- VII. Tierische Lebensmittel als Quelle von STEC Infektionen des Menschen: Besteht ein Zusammenhang zwischen Lebensmittelkategorie und humanpathogenem Potential der STEC?
A. Martin et al., Berlin
- VIII. Vergleichende Untersuchungen von STEC/VTEC und EHEC bei Mensch, Tier und Lebensmitteln im Rahmen der amtlichen Überwachung (2005 – 2010)
U. Messelhäuser et al., Oberschleißheim

EHEC in Tier und Umwelt

- IX. In vitro-Evaluation von rekombinanten *E. coli* Shigatoxoiden als Impfstoffkandidaten für Rinder
K. Kerner et al., Giessen
- X. Wirkung von *Escherichia (E.) coli* Shigatoxin 1 auf bovine Makrophagen *in vitro*
D. Loos et al., Giessen
- XI. Shiga-toxin bildende *Escherichia coli* bei Milchvieh: Ausscheidungsmuster und Einflussfaktoren
A. Menrath et al., Kiel
- XII. Mathematical models for the emergence and persistence of VTEC in German beef calves
L. Geue et al., Wusterhausen
- XIII. Shigatoxin (Stx-) Bildung bei Stx2e-kodierenden *Escherichia coli* (EDEC)-Stämmen von Schweinen
J. Fröhlich et al., Giessen

EHEC in Tier und Umwelt

- XIV. Shigatoxin-Subtypen und Virulenzfaktoren oviner und capriner STEC-Isolate
E. Stüber et al., München
- XV. Etablierung der Serotypisierung der Verotoxin produzierenden *Escherichia coli*-Isolate aus dem Österreichischen Zoonose-Monitoring 2009
S. Fink et al., Graz

Pathogene *E.coli*

- XVI. Comparative analyses of Genomic O Island (OI) 122 in LEE positive Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) from cattle
K. Heidemanns et al., Berlin
- XVII. Duplex-PCR zur Differenzierung von *Escherichia coli* und *Shigella* spp.
M. Pavlovic et al., Oberschleißheim

Pathogenitätsfaktoren und Genomics

- XVIII. Verbreitung von Typ III Effektorgenen pathogener *Escherichia coli* aus humanen, tierischen sowie Lebensmittelproben unter phylogenetischen Aspekten
K. Creuzburg et al., Stuttgart
- XIX. Untersuchung differentieller Proteinexpression enterohämorrhagischer *E. coli* mittels 2D-Gelelektrophorese
S. Polzin et al., Stuttgart
- XX. fliC types of clinically important non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*
W. Zhang et al., Münster
- XXI. Expression von Shiga Toxin-Rezeptoren in humanen Karzinomzelllinien der Bauchspeicheldrüse
W. Storck et al., Münster
- XXII. Verbreitung der Gene des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG und Expression unterschiedlicher Phänotypen bei Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*
V. Merkel et al., Münster
- XXIII. In vivo-Evolution und Genomsequenzen enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) O26:H11 und O145:H28
S. Bletz et al., Münster
- XXIV. Reduktion der Oberflächenexpression der Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 auf Tubulusepithelzellen durch Shigatoxin 2
S. Ehrlenbach, R. Würzner and D. Orth, Innsbruck
- XXV. Das molekulare Arrangement von Glykosphingolipid-Rezeptoren in lipid rafts beeinflusst die biologische Wirkung von Shiga Toxinen
J. Betz et al., Münster

I.

Phenotypic and genotypic characterization of human clinical O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated between 2000 and 2009 in Switzerland

Ursula Käppeli¹, Herbert Hächler¹, Nicole Giezendanner¹, Tom Cheasty², Roger Stephan¹

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

²Laboratory of Gastrointestinal Pathogens, HPA Centre for Infections, London, UK

Keywords: Shigatoxin, O157, menschliche Isolate, Epidemiologie

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) can cause mild diarrhea up to severe haemorrhagic colitis (HC), sometimes followed by life-threatening complications such as haemolytic uremic syndrome (HUS). While various O:H serotypes are involved, members of the O157 serogroup are still responsible for the largest part of the burden caused by STEC. There are two major clonal complexes of O157 pathogens, the classical non-sorbitol-fermenting (nSF) O157:H7, and the sorbitol-fermenting (SF) O157:H⁻ (non-motile) lineages. Moreover, various *stx* profiles exist among all variants. Since few specific data are available in Switzerland, the aim of the present study was to characterize the human O157 isolates collected over the past decade.

A total of 44 O157 strains from different patients were obtained from the Swiss National Centre for Enteropathogenic Bacteria (NENT), and were confirmed by classical serotyping and PCRs directed at *stx*, *eae* and *ehxA* genes as well as *rfbE* and *fliC*[H7]. The strains were then further characterized regarding sorbitol fermentation (SF), phage typing (PT), multilocus sequence typing (MLST) (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), harmonized pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and antimicrobial susceptibility testing (AST). Moreover, they were linked to anamnestic data.

Non-bloody diarrhea was experienced by 16%, HC by 61% of the patients, and 30% developed HUS, 85% of which were infected by nSF O157:H7, 7.5% by SF O157:H⁻, and 7.5% by nSF O157:H⁻. Of the 9% SF strains, all were non-motile, as opposed to only 17.5% among the nSF strains. Whereas all isolates were positive for *stx2*, *eae*, and *ehxA*, only 52% tested positive for additional *stx1*. Among the 44 strains, 9 PTs were detected, the most frequent ones being PT 32 (43%), PT 8 (18%), and PT 49 (9%). Interestingly, all strains belonged to the ML-sequence type 11, while PFGE discriminated between 38 different profiles, only 3 of which represented > 1 strain. Two isolates were resistant to tetracycline, and two intermediate to cephalothin.

Comparisons with data from studies about isolates from other countries during overlapping time periods will be discussed.

II.

Multilocus sequence types and further characteristics of sorbitol-fermenting *E. coli* O157:nonH7 isolates from cattle, pig and sheep

Roger Stephan¹, Katrin Heidemanns², Nicole Giezendanner¹, Claudio Zweifel¹, Lothar Wieler²

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

²Institute of Microbiology and Epizootics, Free University Berlin, Germany

Keywords: Shigatoxin, O157, menschliche Isolate, Epidemiologie

An evolutionary model postulates that *E. coli* O157:H7 evolved from ancestral *E. coli* O55 by stepwise acquisition or loss of virulence and phenotypic traits, resulting in the common non-sorbitol-fermenting (nSF) O157:H7 clonal complex, and a second branch of sorbitol-fermenting (SF) O157:H⁻ strains. The vast majority of *stx*-positive and *stx*-negative SF and nSF O157:H7/H⁻ human isolates belong to MLST sequence type (ST) ST11 and clonal complex (CC) CC11. Up to now, no phylogenetic and only very limited genetic characterization data are available for SF O157:nonH7 strains.

In this study, we examined 21 SF *E. coli* O157:nonH7 strains by MLST and using PCR for different genotypic traits. The strains were previously isolated from fecal samples of healthy cattle, pig and sheep using dot-blot hybridization and belong to the serotypes O157:H2, O157:H8, O157:H12, O157:H18, O157:H19, O157:H25, O157:H27, O157:H38, O157:H43, O157:H45, O157:H48, O157:H54 and O157:H⁻.

None of the strains harboured *stx* variants or was PCR positive for *ehxA*, *sfpA*, *ureD* or *eaf1*. However, the two O157:H45 strains harboured *eae a1* and *bfpA* properties commonly found with typical EPEC strains. PCR amplification and sequencing of the seven MLST loci was successful for 12 of the 21 strains. The distinct combinations of all alleles across the seven MLST loci defined different sequence types among these strains: ST10 (O157:H12), ST88 (O157:H12), ST117 (O157:H18), ST716 (O157:H38, O157:H⁻), ST763 (O157:H19), and STunknown (O157:H8, O157:H27, O157:H38, O157:H43). For five genes (*adk*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *recA*) new allelic types were found in the remaining nine strains.

III. Risikofaktoren für Langzeitprobleme des EHEC assoziierten HUS

A Rosales¹, J Hofer¹, P Pedevilla¹, M Riedl¹, E Tengg¹, TC Jungrathmayr¹, R Würzner², A Gerber³, H Fehrenbach⁴, K Werber⁵, A Strasak⁶, H Karch⁷, LB Zimmerhackl¹.

¹ Department für Pädiatrie 1, Medical University of Innsbruck, Austria; ² Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Austria; ³ Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Universität Freiburg, Germany; ⁴ Kinderklinik Memmingen, Memmingen, Germany; ⁵ Robert Koch Institut, Berlin Germany; ⁶ Department für Medizinische Statistik, Informatik und Gesundheitsökonomie, Medizinische Universität Innsbruck; ⁷ Institut für Hygiene, Universität Münster, Germany.

Das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) ist die häufigste Ursache von Niereninsuffizienz im Kindesalter und die Infektion mit Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) die häufigste Ursache für diese Erkrankung.

Das Register „klassisches HUS“ wurde im Jahr 1997 begonnen und die Beobachtung der Akutphase am 31.12.2002 beendet. Derzeit werden nur noch Langzeitergebnisse zusammengetragen. Eines der Ziele dieser Studie war es den Zusammenhang zwischen der akuten Präsentation der Erkrankung und dem Auftreten von Langzeitproblemen zu evaluieren.

Als Risikofaktoren für Langzeitprobleme gelten: eine schwere arterielle Hypertonie, zunehmende Dialysedauer und Leukozytenzahl über 20000 in der Akutphase, Alter unter einem Jahr bei Erkrankungsbeginn und non-O157 Serotypen als Verursacher der Erkrankung. Nach 2 Jahren haben 24% der Patienten irgendein Symptom, wie Proteinurie, neurologische Auffälligkeiten, GFR < 80, Hypertonie oder Kreatinin > 1. Nach 5 Jahren sind diese 31 %. Bei Patienten wo kein EHEC nachgewiesen werden konnte, betrug der Prozentsatz der Patienten mit einem der obengenannten Symptome nach 5 Jahren 60%.

HUS ist eine kritische Erkrankung nicht nur in der Akutphase. Unsere Studie unterstreicht die Bedeutung von langzeit follow up bei HUS Patienten.

IV. Zur Möglichkeit einer pharmakologischen Eradikation bei Dauerausscheidern von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)

Frank Wiedemann, Annette Heißenhuber, Bernhard Liebl, Manfred Wildner, Ulrich Busch
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim

Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) führen zu wässrig-blutiger Diarrhoe und können, insbesondere bei Kindern, ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) als lebensbedrohliche Komplikation verursachen. Bei Erwachsenen verlaufen EHEC-Infektionen häufig asymptomatisch oder als selbstlimitierende Enteritis. Als obligates Merkmal besitzen EHEC die Fähigkeit, Shigatoxine bilden zu können, welche in zwei Hauptgruppen (stx1 und stx2) mit mehreren Varianten unterteilt werden. Die Ausscheidungsdauer wird in der Literatur mit 13 bis 21 Tagen angegeben (1), wobei auch längere Zeiträume beschrieben wurden (2). Der Nachweis von EHEC bei erkrankten oder asymptomatischen Personen, welche in der Lebensmittelindustrie bzw. mit dem Inverkehrbringen von Lebensmitteln oder in Gemeinschaftseinrichtungen beschäftigt sind, führt gemäß den §§ 34 und 42 des Infektionsschutzgesetzes (IFSG) zu einem vorübergehenden Beschäftigungsverbot, bis drei aufeinander folgende negative Stuhlproben vorliegen. Somit besteht auch ein bedeutendes sozioökonomisches Interesse die Ausscheidungsdauer zu verkürzen, um den betroffenen Personen eine schnellere Wiederaufnahme ihrer Tätigkeit zu ermöglichen und einer sozialen Stigmatisierung entgegen zu wirken.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Möglichkeit für die Erstellung einer Behandlungsempfehlung für Dauerausscheider von EHEC kritisch zu untersuchen. Es wurde eine Ausscheidungsdauer von mindestens 60 Tagen vorausgesetzt, um der Falldefinition des Dauerausscheiders zu entsprechen. Die zur Diskussion gestellten Empfehlungen basieren hauptsächlich auf der Arbeit von Jensen et al., in der eine erfolgreiche antibiotische Eradikationstherapie bei asymptomatischen Langzeitausscheidern von EHEC mit niedrigem Virulenzprofil beschrieben wurde.

Von den am LGL eingegangenen Stuhlproben des Zeitraumes Januar 2007 bis Dezember 2009 wurden 33 Personen identifiziert, die der Falldefinition entsprachen. Nach Geno- und Serotypisierung der Stämme könnte nach den zu Grunde liegenden Empfehlungen von Jensen und Scheutz in 28 Fällen (85%) eine antibiotische Behandlung zur Eradikation durchgeführt werden. Ausgeschlossen wurden diejenigen Fälle, bei denen ein Genotyp nachgewiesen werden konnte, der mit einem erhöhten Risiko für ein HUS einhergeht. Zur weiteren kritischen Bewertung einer antibiotischen Eradikation könnte u.a. eine randomisierte klinische Studie durchgeführt werden, um einen kausalen Zusammenhang zwischen antibiotischer Behandlung und Verkürzung der Ausscheidungsdauer weiter zu erhärten.

1. Karch, H., et al., *Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 in diarrheal diseases*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(6): p. 1602-5.
2. O'Donnell, J.M., et al., *Outbreak of Vero cytotoxin-producing Escherichia coli O157 in a child day care facility*. Commun Dis Public Health, 2002. **5**(1): p. 54-8.
3. Jensen, C., et al., *Antimicrobial treatment of asymptomatic carriers of verocytotoxin-producing Escherichia coli: an empiric study*. Scand J Infect Dis, 2005. **37**(1): p. 61-3.

V. Phagenligand-basierende selektive Voranreicherung (AMS) für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 nach DIN 10167 sowie für den Nachweis mittels Real-time PCR

Michael Schütz¹, Elisabeth Stüber², Céline Finke², Karolina Heed¹

¹Hyglos GmbH, Regensburg

²Lehrstuhl für Lebensmittelhygiene, Tierärztliche Fakultät, LMU München

Keywords: Phagenligand; *Escherichia coli* O157; DIN 10167; Fleischproben; Selektive Voranreicherung

Bakteriophagenproteine sind aufgrund ihrer hohen Spezifität zur selektiven Anreicherung und zum Nachweis pathogener Keime aus Nahrungsmitteln geeignet [1, 2].

In dieser Studie wurde die Anwendung einer auf Phagenliganden basierenden AMS (Affinitätsmagnetische Separation) zur Voranreicherung von *E. coli* O157 für einen Nachweis nach DIN 10167 sowie für den Nachweis mittels Real-time PCR (foodproof® *E. coli* O157 Detection Kit) untersucht.

Hackfleischproben wurden auf Kontamination mit *E. coli* O157 einmal nach DIN 10167 über IMS (immunomagnetische Separation) und vergleichend dazu über AMS untersucht. Der Nachweis über AMS nach DIN 10167 erbrachte übereinstimmende Ergebnisse verglichen zum Nachweis über IMS nach DIN 10167. Mit dem AMS-Verfahren zeigte sich ein deutlich geringerer Hintergrund auf den Selektivnährböden, was die Identifizierung von potentiellen *E. coli* O157 Kolonien wesentlich erleichterte. Zusätzlich wurden die Proben nach AMS mit *E. coli* O157 spezifischer Real-time PCR untersucht. Der Nachweis über PCR nach AMS-Anreicherung identifizierte dieselben Proben als kontaminiert bzw. nicht kontaminiert wie die Referenzmethode DIN 10167.

Die vergleichende Studie zeigt, dass die AMS eine gute Alternative zu IMS im Rahmen der DIN 10167-Methode darstellt. Zusätzlich kann über AMS mit Real-time PCR die Nachweiszeit für *E. coli* O157 erheblich reduziert werden.

1. Kretzer J, Grassl R, Biebl M, Miller S. Anwendung von Bakteriophagenproteinen zur spezifischen Separation von *Escherichia coli* O157 aus Lebensmitteln. Stuttgart: 10. Fachsymposium der DGHM-Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie, 2008

2. Rozand C, Feng P.C.H. Specificity analysis of a novel Phage-derived ligand in an Enzyme-Linked Fluorescent Assay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Food Protection®, 2009; 72: 1078-1081

VI. Simultaner Nachweis von EHEC und EPEC Isolaten mit Multiplex Real-Time PCR

Melanie Pavlovic, Katja Meindl, Ulrich Busch, Ingrid Huber

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim

Zum Nachweis von EHEC- und EPEC-Pathovaren wurde eine 5'Nuklease Multiplex Real-Time PCR entwickelt, mit der simultan die Shigatoxin-kodierenden Gene *stx1* und *stx2* und das Gen des Pathogenitätsfaktors Intimin *eae* detektiert werden. Zum Ausschluß der Anwesenheit inhibitorischer Stoffe im PCR-Reaktionsgemisch wurde eine interne heterologe Amplifikationskontrolle [1] in die Multiplex-PCR integriert.

Die Nachweisgrenze sowie die Selektivität der Multiplex Real-Time PCR wurden ermittelt. Zur Bestimmung der Inklusivität der Methode wurden neben EHEC- und EPEC-Referenzstämmen auch Proben aus der LGL-Routinediagnostik parallel zu dieser untersucht.

Mit der neu entwickelten Nachweismethode konnten alle 11 untersuchten Varianten des *eae*-Gens, alle bekannten Varianten des *stx1*-Gens (*stx1/1c/1d*) sowie des *stx2*-Gens (*stx2/2c/2d/-2e/2f/2g*) detektiert werden. Ferner wurden die nachzuweisenden Pathogenitätsfaktoren bei den untersuchten EHEC- und EPEC-Stämmen ohne Ausnahme richtig identifiziert. Alle Referenzstämmen, die zur Überprüfung der Exklusivität eingesetzt wurden (darunter auch EIEC-, ETEC- und EAEC-Pathovaren), zeigten mit der Multiplex Real-Time PCR 100% Exklusivität. Die Eigenschaft der hier vorgestellten Methode, die kürzlich auch für den Menschen als pathogen in Erscheinung getretene Variante *stx2f* (Prager et al., 2009), detektieren zu können, ist ein klarer Vorteil gegenüber anderen bereits publizierten Multiplex Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von EHEC/EPEC, die diese Variante nicht detektieren.

[1] Anderson A, Pietsch K, Zucker R, Mayr A, Müller-Hohe E, Messelhäuser U, Sing A, Busch U, Huber I; Validation of a duplex Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products. 2010; *Food Analytical Methods* DOI: 10.1007/s12161-010-9142-8.

VII. Tierische Lebensmittel als Quelle von STEC Infektionen des Menschen: Besteht ein Zusammenhang zwischen Lebensmittelkategorie und humanpathogenem Potential der STEC?

Annett Martin¹, Christine Müller-Graf¹ & Lothar Beutin²

¹Epidemiologie, Biometrie und mathematische Modellierung

²Nationales Referenzlabor für Escherichia coli (NRL-E.coli), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

In unseren Untersuchungen analysierten wir 593 STEC aus Lebensmitteln tierischer Herkunft die zu 210 Serotypen gehörten. Es wurden 7 Lebensmittelkategorien definiert: 1. Milch-(produkte) vom Rind (n=131), 2. Fleisch-(produkte) vom Rind (n=171), 3. Fleisch-(produkte) vom Hausschwein (n=83), 4. Fleisch-(produkte) vom Wildschwein (n=37), 5. Fleisch-(produkte) vom Rotwild (n=117), 6. Hasenfleisch (n=21), 7. Milch- und Fleisch-(produkte) von Ziegen und Schafen (n=33). In allen Fällen lagen vollständige Angaben zu den STEC-Serotypen (N= 210), den Shiga-Toxin (Stx) Genotypen, sowie zu den Virulenzgenen für Intimin (*eae*) und für Entero (EHEC)-Hämolysin (*E-hly*) vor.

Zur Gruppierung der STEC wurde das von Karmali et al. (2003) beschriebene Schema der „Seropathotypen“ zugrundegelegt. Aus der Literatur wurde ermittelt, welche STEC Serotypen bereits als Verursacher von Erkrankungen des Menschen beschrieben wurden und drei Gruppen gebildet. Gruppe 1: potentiell schwere Infektionen (HUS, HC), Gruppe 2: potentiell leichte Infektionen (Durchfall), Gruppe 3: bisher kein Bezug zu Erkrankungen. Es ist bereits bekannt, dass bestimmte Virulenzfaktoren (Stx-Genotyp, *eae* und *E-hlyA*-Gen) mit erhöhter Virulenz der STEC für den Menschen assoziiert sind. Daher wurden außer dem Serotyp, der Stx-Genotyp, das *eae* und *E-hlyA* Gen in univariaten und multivariaten Analysen im Zusammenhang mit der Herkunft der STEC (Lebensmittelkategorie) untersucht.

Ergebnisse: 25,0% (N=148) der STEC-Stämme aus Lebensmitteln tierischer Herkunft gehören zu Serotypen, die im Zusammenhang mit HUS / HC beschrieben wurden, 40,1% der STEC aus Lebensmitteln haben einen Bezug zu leichteren Verläufen (Durchfall), und 34,9% der STEC-Isolate wurden bisher noch nicht in Verbindung mit Humaninfektionen gebracht.

STEC-Serotypen, die bisher mit schweren Krankheitsverläufen (HUS, HC) in Verbindung gebracht wurden, traten am häufigsten bei Fleisch- und Wursterzeugnissen vom Rind (43,3%), bei Milch- und Milchprodukten vom Rind (22,9%) sowie bei Hasenfleisch (33,3%) auf.

Bei STEC aus Lebensmitteln waren die Virulenzmerkmale Stx1 ($p < 0,01$), Stx2 ($p < 0,001$), *E-hly* ($p < 0,001$) und *eae* ($p < 0,001$) signifikant häufiger mit Serotypen assoziiert, die bei Menschen aus HC und HUS isoliert wurden. Stx2e ($p < 0,001$) war dagegen signifikant häufiger bei STEC Serotypen, die nicht oder nur bei leichten Krankheitsverläufen des Menschen beschrieben wurden. Ein Ziel der Analysen war es herauszufinden, ob Wechselwirkungen zwischen den Virulenzfaktoren der STEC und der Lebensmittelkategorie bestehen, die mit der Entwicklung und Schwere einer Erkrankung in Zusammenhang stehen.

VIII.

Vergleichende Untersuchungen von STEC/VTEC und EHEC bei Mensch, Tier und Lebensmitteln im Rahmen der amtlichen Überwachung (2005 – 2010)

Ute Messelhäuser, Carolin Schreiber, Katja Meindl, Jasmin Fräsdorf, Sabine Wolf, Andreas Sing, Ulrich Busch

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststellen
Oberschleißheim und Erlangen

In einem Zeitraum von fünf Jahren werden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) ca. 18.000 humane Stuhlproben, 1.100 Kotproben, 1.500 Lebensmittel- und 3.800 Wasserproben auf das Vorhandensein von STEC/VTEC bzw. EHEC untersucht. Dabei umfasst der humanmedizinische Einzugsbereich Gesamt-Bayern, während Kot-, Lebensmittel- und Wasserproben schwerpunktmäßig im südbayerischen Raum entnommen werden. Eine weitergehende Charakterisierung der Isolate erfolgt sowohl molekularbiologisch (PCR und real-time-PCR) als auch serologisch. Routinemäßig erfolgt ein Nachweis der unterschiedlichen *stx*-Gene, des *eae*-Gens sowie des *hly*-Gens, bei Bedarf eine weitere Subtypisierung der *stx*-Gene sowie der Nachweis des Subtilase-Gens.

Aufgrund der für Deutschland sehr außergewöhnlichen Situation, dass Daten aus dem Veterinär-, Human-, Lebensmittel- und Wasserbereich in einem Analyselabor zusammenlaufen, besteht hier die Chance, auch über längere Zeiträume vergleichende Auswertungen zu STEC/VTEC und EHEC-Nachweisen in den unterschiedlichen Matrices durchführen zu können. Ein Überblick über die in den vergangenen 5 Jahren erhobenen Daten aus den unterschiedlichen Bereichen wird vorgestellt. Derartige vergleichende Untersuchungen können nicht nur zur Aufklärung von Infektketten im Einzelfall, sondern auch zu umfassenderen Risikobewertungen bestimmter Matrix-Erreger-Kombinationen im Sinne des gesundheitlichen Verbraucherschutzes genutzt werden.

IX.

In vitro-Evaluation von rekombinanten *E. coli* Shigatoxoiden als Impfstoffkandidaten für Rinder

Katharina Kerner^{1,4}, Philip S. Bridger¹, Daniela Loos³, Gabriele Köpf¹, Julia Fröhlich¹, Hermann Willems², Georg Baljer² und *Christian Menge*^{1,4}

¹Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

²Klinik für Schweine, Justus-Liebig-Universität Giessen

³Paul-Ehrlich-Institut, Langen

⁴Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena

Keywords: Shigatoxin, Rind, rekombinante Stx-Variante, Impfstoffkandidat

Rinder stellen das natürliche Reservoir von zoonotischen, Shigatoxin (Stx) produzierenden *E. coli* (STEC) dar. Stx supprimiert das bovine Immunsystem und fördert so bei der STEC-Erstinfektion im Kälberalter die Etablierung einer persistierenden Infektion. Die Induktion eines antitoxischen Immunschutzes vor der Erstinfektion könnte die immunsupprimierende Wirkung von Stx verhindern und die Dauer und den Umfang der STEC Ausscheidung bei Rindern reduzieren.

Als Impfstoffkandidaten wurden rekombinant hergestellte Stx-Varianten (rStx-M) ohne zytotoxische Aktivität für Verozellen generiert. Dazu wurden je zwei Punktmutationen in das *stxA* Gen von Stx1 und Stx2 eingeführt. Der Effekt der Punktmutationen wurde durch vergleichende Untersuchungen mit zytotoxischen rStx1 und rStx2 in *in vitro* Systemen mit Immunzellen des Rindes überprüft.

In intraepithelialen Lymphozyten aus dem Ileum (n=3) konnte nach der Inkubation sowohl mit rStx1 als auch mit rStx2 ein Anstieg der Transkriptionsraten für IL-4 mRNA nachgewiesen werden. In Kulturen von Lymphozyten aus dem peripheren Blut (n=6) reduzierte die Inkubation mit rStx1 oder rStx2 den Anteil Zellen, die im Rahmen ihrer Aktivierung den Stx-Rezeptor CD77 exprimierten. Bei in Teflonbeutel generierten, primären Makrophagen (n=5) reduzierte rStx1 die Expression von CD14 auf CD77⁺ Zellen. Weder rStx1-M noch rStx2-M lösten in vergleichbaren Konzentrationen einen dieser Effekte aus.

Die Bindung der Toxin-Varianten wurde in einem kompetitiven ELISA durch bovine Seren mit Antikörpern gegen Stx1 (n=19) bzw. Stx2 (n=4) jedoch in gleichem Maße behindert wie die Bindung der Wildtyp-Toxine.

Mit dem Verlust der zytotoxischen Eigenschaften haben die rStx-M Varianten auch ihre immunsuppressiven Eigenschaften verloren, ihre Antigenität jedoch erhalten. Die rStx-M stellen somit geeignete Impfstoffkandidaten für die Immunisierung von Rindern gegen STEC dar.

X.**Wirkung von *Escherichia (E.) coli* Shigatoxin 1 auf bovine Makrophagen in vitro**

Daniela Loos^{1,2}, Philip S. Bridger¹, Dirk Werling³, Georg Baljer¹ und Christian Menge^{1,4}

¹Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen

² Paul-Ehrlich-Institut, Langen

³Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College, London und

⁴Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena

Keywords: Shigatoxin, Rind, Makrophagen

Beim STEC-assoziierten Hämolytisch-Urämischen Syndrom des Menschen ist die Wirkung der Shigatoxine (Stx) auf Makrophagen (Mø) von zentraler Bedeutung für die Pathogenese. STEC-Infektionen bei Rindern, dem wichtigsten tierischen Reservoir der Erreger, verlaufen meist asymptomatisch. Bei dieser Tierart wirken Stx aber regulatorisch auf T-Lymphozyten und begünstigen die Entstehung persistenter STEC-Infektionen. Mø in der *Lamina propria* der bovinen intestinalen Mukosa exprimieren den Stx-Rezeptor CD77 *in situ* [1]. Es sollte deshalb geklärt werden, ob auch bovine Mø für Stx1 sensibel sind.

Mononukleäre Zellen aus dem Blut adulter Rinder wurden zunächst für 8 Tage in Teflonbeuteln inkubiert und dann in unbeschichteten Zellkulturgefäßen (Plastik) ausgesät. Nach Entfernung nicht-adhärenter Zellen wurden die Mø mit Stx1, Stx1 plus neutralisierendem Antikörper, mit LPS (*E. coli*) oder ohne Zusätze inkubiert.

In durchflusszytometrischen (DFZM) Untersuchungen war in allen Mø intrazelluläres CD77 nachweisbar. CD77 konnte auch auf der Oberfläche von, je nach Kultur, bis zu 70 % der Zellen detektiert werden. Weiterhin banden Mø eine rekombinant hergestellte StxB1-Untereinheit mit hoher Affinität.

Im DFZM-basierten Phagozytostest erhöhte Stx1 innerhalb von nur 30 min. die Fähigkeit der Mø zur Phagozytose von opsonierten FITC-markierten *E. coli*. Real-Time RT-PCR zeigte, dass Stx1 innerhalb von 4 h die Menge an Transkripten für IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-8 und GRO- α steigerte. Während nach Inkubation mit LPS für 4 h die Expression von CD80 und CD86 anstieg, fiel nach Inkubation mit Stx1 für 4 bzw. 24 h die Expression beider Antigene signifikant ab (DFZM-Analyse). Die Inkubation boviner Mø mit Stx1 für mehr als 24 h führte zum Zelltod. Zugabe des Stx1-spezifischen Antikörper hemmten die beobachteten Effekte.

Die Wirkung des Stx1 auf bovine Mø *in vitro* zeigt, dass dieser Zelltyp neben T-Zellen eine weitere Zielzelle für Stx bei STEC-Infektionen des Rindes darstellt. Zusätzlich zur direkten Inhibition greifen die Stx möglicherweise schon auf der Ebene der Antigen-präsentierenden Zellen in die T-Zell-Aktivierung ein und verzögern die Ausbildung einer spezifischen zellulären Immunität.

[1] Stamm I, Mohr M, Bridger PS, Schröpfer E, König M, Stoffregen WC, Dean-Nystrom EA, Baljer G, Menge C. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Infect Immun* 2008; 76: 5381-5391

XI.

Shiga-toxin bildende *Escherichia coli* bei Milchvieh: Ausscheidungsmuster und Einflussfaktoren

A. Menrath¹; K. Heidemanns²; L.H. Wieler²; T. Semmler²; A. Fruth³ und N. Kemper¹

¹Institut für Tierzucht und Tierhaltung, Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

²Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Veterinärmedizinische Fakultät, Freie Universität Berlin

³Robert Koch-Institut, Nationales Referenzzentrum für Salmonella und andere bakterielle Enteritiserreger, Wernigerode

Keywords: Milchvieh, Shiga-Toxin, Risikofaktoren-Analyse, Ausscheidungsmuster

Ziel dieser Studie war es, die fäkale Ausscheidung von STEC durch Milchkühe über den Lauf eines Jahres zu untersuchen und verschiedene Einflussfaktoren zu bewerten. Die Probennahme erfolgte monatlich auf sechs Milchvieh-haltenden Betrieben in Schleswig-Holstein. Dabei wurden 1.646 Kotproben von 140 Kühen genommen. Durch Screening der angereicherten Proben mittels *stx*-PCR wurden positive Tiere identifiziert, STEC isoliert und diese durch PCR-gestützte Analyse weiterer Virulenzfaktoren und zum Teil durch Serotypisierung charakterisiert. Zur Auswertung wurden darüber hinaus Informationen zum Herdenmanagement, dem Ernährungs- und Gesundheitszustand, der Milchleistung und der Milchinhaltsstoffe, der Anzahl der absolvierten Laktationen und dem Laktationstag herangezogen. Die Daten wurden mit der Prozedur „Logistic“ (SAS[®]) statistisch ausgewertet. Insgesamt waren 24,7% (407) aller Proben *stx*-positiv in der Screening-PCR. Von 140 Kühen wurden 122 (87,1%) Tiere mindestens einmal als *stx*-positiv detektiert. Vierzehn Kühe (10,0%) wurden in mehr als der Hälfte ihrer Kotproben und bei mindestens vier aufeinander folgenden Beprobungen als *stx*-positiv nachgewiesen. Diese Tiere wurden als kontinuierliche Ausscheider definiert. Die dominierenden Virulenzprofile der 1.105 isolierten STEC waren *stx*₂ *EHEC-hly*_A (434 Isolate, 39,3%) und *stx*₁ *stx*₂ *EHEC-hly*_A (311 Isolate, 28,1%). Bei der Serotypisierung von 61 STEC zeigte sich, dass einige der 24 nachgewiesenen nonO157:H7-Serovare an zwei bis zu fünf aufeinanderfolgenden Beprobungsterminen beim Einzeltier nachweisbar waren. Zwölf der isolierten STEC-Serovare wurden bereits mit humanen Erkrankungen assoziiert. In der Reihenfolge absteigender Häufigkeiten waren die fünf dominierenden *E. coli*-Serovare: O113:H-, O22:H8, Ont:H25, O130:H11 und O8:H19. Ein signifikanter Einfluss auf die STEC-Ausscheidung wurde für mehrere Faktoren nachgewiesen. Hierzu zählten die Jahreszeiten (Odds Ratio (OR)_{Sommer} = 1.64, OR_{Herbst} = 2.35, OR_{Winter} = 1.60 alle vs. Frühjahr), die Anzahl der absolvierten Laktationen (OR_{Erstkalbinnen vs. >3 absolvierte Laktationen} = 1.74) und der Laktationstag (OR_{51.-100. d} = 1.73, OR_{101.-150. d} = 1.93, OR_{>350. d} = 2.06, OR_{trocken stehende Kuh} = 1.67 alle vs. Kühe im ersten bis 50. Laktationstag), der Ernährungszustand (OR_{BCS > 3.5 vs. <3.5} = 1.92), die somatische Zellzahl (SSC) in der Milch pro Milliliter (OR_{SSC <100,000 vs. >100,000} = 1.57), der Proteingehalt der Milch in Prozent (OR_{3.00-3.80 vs. <3.00} = 1.80, OR_{>3.80 vs. <3.00} = 2.30) und die Anwesenheit eines als kontinuierlich ausscheidend definierten Tieres in der Herde (OR_{Tier in Herde vs. kein Tier} = 2.63). Mit dieser Studie wurde die Bedeutung kontinuierlich nonO157-STECAusscheidender Tiere für den Infektionszyklus innerhalb des Bestands aufgezeigt.

XII.

Mathematical models for the emergence and persistence of VTEC in German beef calves

Lutz Geue¹, Dörte Döpfer^{2,3}, Egil Fischer³, Fimme J. Van der Wal⁴; Bernd Hoffmann⁵,
M. C. M. De Jong⁶

¹Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie, Wusterhausen, Germany

²QVERA, Department of Virology, Central-Vet. Institute, ASG-WUR, Lelystad, NL

³Department of Medical Sciences, SVM, UW-Madison, USA

⁴Department of Bacteriology, Central-Vet. Institute, ASG-WUR, Lelystad, NL

⁵Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Virusdiagnostik, Greifswald-Insel Riems

⁶Quantitative Vet. Epidemiology, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, NL

Keywords: SIS model, emergence and persistence of VTEC

The aim of the study was to study the emergence and persistence of virulence markers for potentially zoonotic verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) in 25 German beef calves. For the duration of 25 weeks, fecal samples were collected weekly and selectively cultured for *E. coli*. Twenty isolates per calf and week of the study were screened for the verotoxin genes (*stx1* and *stx2*), intimin, haemolysin, and two adhesins (*efa1* and *saa*) by realtime PCR. Transmission models of infection (SIS models) were used to study the transmission of selected combinations of virulence markers over time. It was found that calves that were shedding *E. coli* encoding for verotoxins, haemolysin or for intimin were prone to acquire VTEC encoding for the combination of either verotoxin and haemolysin or verotoxins and intimin at the same rate as other *E. coli*, but there was a significant difference in the rates of loss for the *E. coli* encoding for the combinations of verotoxins with intimin and for the combinations of verotoxins with haemolysin when compared with *E. coli* that encoded for the verotoxins alone.

If haemolysin- or intimin-encoding *E. coli* represented a predisposition for acquiring and not loosing *E. coli* with combinations of virulence markers that are potentially zoonotic, a new light would be shed on the micro-ecology in the ruminant reservoir. The implications for innovative interventions aimed at reducing the acquisition of VTEC will be discussed.

XIII.

Shigatoxin (Stx-) Bildung bei Stx2e-kodierenden *Escherichia coli* (EDEC)-Stämmen von Schweinen

Julia Fröhlich, Ines M. Jost, Stefanie Barth und Rolf Bauerfeind

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

Keywords: EDEC, Stx2e, Ödemkrankheit, antimikrobielle Wirkstoffe

Die Ödemkrankheit (ÖK) der Schweine ist eine weltweit verbreitete und wirtschaftlich bedeutsame Erkrankung der Absetzferkel. Sie wird durch wirtsadaptierte *E. coli*-Stämme hervorgerufen, welche Stx2e und F18-Fimbrien bilden (Edema Disease *E. coli*, EDEC). Da Stx2e der entscheidende Virulenzfaktor in der Pathogenese der ÖK ist, könnte die Fähigkeit, das Toxin freizusetzen, ein Maßstab für die Virulenz von EDEC-Stämmen sein. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob Stx2e-kodierende *E. coli*-Stämme von Schweinen das Gen überhaupt exprimieren und sich gegebenenfalls durch Stressoren zur gesteigerten Stx2e-Freisetzung stimulieren lassen. Dabei wurde die Wirkung der Bakteriophagen-induzierenden Noxen Mitomycin C (MMC) und UV-Licht (UV) mit den Effekten der sechs antimikrobiellen Wirkstoffe (AW) Amoxicillin, Colistin, Enrofloxacin, Erythromycin, Neomycin und Tetracyclin verglichen. Zunächst wurde das in den Kulturüberstand sezernierte und das zellassoziierte Stx2e bei 364 porcinen STEC-Stämmen mittels ELISA und Verozell-Zytotoxizitätstest quantifiziert. Die Kulturüberstände von 30 repräsentativen Stämmen wurden nach Einwirkung der verschiedenen Stressoren im ELISA auf freigesetztes Stx2e sowie im Plaquetest auf das Vorhandensein lytischer Bakteriophagen überprüft.

Stx2e war in den Kulturüberständen von 356 (97,8 %) Stämmen nachzuweisen. Unter Einwirkung der Stressoren wurde bei 11/30 (37 %) Stämmen mehr Stx2e als bei stressfreier Anzucht freigesetzt. Dabei reagierten 7/30 (23,3 %) Stämmen auf die Anwesenheit eines AW, 6/30 (20 %) Stämmen auf MMC und/oder UV mit einer erhöhten Freisetzung von Stx2e in den Kulturüberstand. Unter MMC und/oder UV-Einwirkung war die freigesetzte Stx2e-Menge im Mittel größer (bis zu 50,8-fach) als unter der Einwirkung von AW (bis 16,9-fach). Die EDEC-Stämme bildeten aber stets signifikant weniger Toxin als zwei Stx2e- bzw. Stx2-kodierende *E. coli*-Referenzstämme humanen Ursprungs, wenn diese mit MMC oder UV stimuliert wurden. Bei 12 der 30 getesteten EDEC-Stämme (40 %) ließen sich lytische Bakteriophagen induzieren, diese kodierten jedoch nicht für Stx2e.

Nach diesen Ergebnissen exprimieren mehr als 95 % aller EDEC-Stämme ihr Stx2e-Gen. Die Stx2e-Bildung ist jedoch unterschiedlich reguliert, weshalb die im Darm infizierter Schweine freigesetzte Stx2e-Menge von den spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Stammes abhängig sein dürfte. Darüber hinaus kann der klinische Verlauf der ÖK bei manchen EDEC-Stämmen durch antimikrobielle Chemotherapeutika, wie sie in der tierärztlichen Praxis üblicherweise Verwendung finden, forciert werden.

XIV. Shigatoxin-Subtypen und Virulenzfaktoren oviner und capriner STEC-Isolate

*Elisabeth Stüber*¹, Carolin Buman¹, Rebecca Bonke¹, Silke Wacheck¹, Roger Stephan² und
Maria Fredriksson-Ahoma¹

¹Lehrstuhl für Lebensmittelhygiene, Veterinärwissenschaftliches Department, Tierärztliche Fakultät, LMU München, Oberschleißheim

²Institut für Lebensmittelsicherheit und Hygiene, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich, Schweiz

Keywords: STEC, kleine Wiederkäuer, Shigatoxin-Subtypen, Virulenzgene

Neben den Shigatoxingenen (*stx*) werden noch weitere Virulenzfaktoren im Zusammenhang mit einer erhöhten Pathogenität von STEC beschrieben. Besonders der Kombination von *stx2* mit dem Intimin-codierenden *eae* und dem Enterohämolysin-codierenden *ehxA*-Gen wird hierbei große Bedeutung beigemessen. Das Ziel dieser Studie war die weitergehende Charakterisierung *stx*-positiver *E. coli* Stämme, die aus Kotproben von Schlachtschafen und Schlachtziegen isoliert wurden

Insgesamt wurden 13 *stx*-positive *E. coli* Isolate, welche aus Kotproben bzw. – tonsillen von Tieren stammten, die an einem schweizer Schlachthof geschlachtet wurden, weitergehend charakterisiert. Dabei waren 3 Isolate ovinen Ursprungs und 10 konnten aus 9 Ziegenproben gewonnen werden. Die Isolate wurden mittels Real-Time PCR und dem Ssofast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) auf die Anwesenheit von 3 Virulenz-assoziierten Genen: *eae*, *ehxA* und *saa* (codierend für das STEC autoagglutinierende Adhäsins) sowie den *stx* Subtypen (*stx1c*, *stx1d*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) untersucht.

Zwei der drei ovinen Isolate waren nur *stx1* positiv und wiesen das *ehxA*-Gen auf. Das dritte Schafisolat war neben *stx1*, *stx2* und *ehxA* auch positiv für *stx2d* und *eae*.

Sieben der zehn caprinen Isolate waren *stx1* und drei Isolate *stx2* positiv. Zusätzlich zu *stx1* waren alle positiv für *ehxA*. Ein Isolat war positiv für *stx1c* und zwei Isolate wiesen ergänzend noch das *eae*-Gen auf. Die drei *stx2*-positiven caprinen Isolate wurden alle positiv auf *ehxA* und *eae* getestet. Zudem waren zwei dieser drei caprinen Isolate ebenfalls positiv für *stx2c*. Alle Isolate waren *stx1d*, *stx2e*, *stx2f* und *saa* negativ.

Unabhängig vom *stx*-Typ war jedes Isolat *ehxA* positiv. Die Kombination von *stx1* und *ehxA* kam sowohl in den ovinen wie auch den caprinen Isolaten am häufigsten vor. Fast die Hälfte der *stx*-positiven Isolate war positiv für *eae* und *ehxA*. Die zudem noch *stx2c* positiven Isolate stellen ein Risiko für schwerwiegende Erkrankungen insbesondere bei Kindern dar und erfordern die Einhaltung der Hygienemaßnahmen bei der Lebensmittelgewinnung aber auch bei direktem Kontakt mit Ziegen, um eine Infektion mit STEC zu verhindern.

XV. Etablierung der Serotypisierung der Verotoxin produzierenden *Escherichia coli*-Isolate aus dem Österreichischen Zoonose-Monitoring 2009

Sabrina Fink², Sabine Neubauer¹, Elisabeth Karner¹, Burkhard Springer¹, Heimo Lassnig³,
Sabine Schlager¹

¹Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, AGES, Graz

²FH Joanneum Graz, Biomedizinische Analytik

³Institut für Veterinärmedizin, AGES, Graz

Keywords: VTEC, Rind, Schaf, Zoonose, Serotypisierung

Wiederkäuer bilden das Hauptreservoir für Verotoxin produzierende *Escherichia coli* (VTEC). Im tierischen Organismus lösen die Erreger kaum Erkrankungen aus, während im Zusammenhang mit humanen VTEC-Infektionen regelmäßig schwerwiegende Komplikationen sowie Todesfälle auftreten.

Im Rahmen des Österreichischen Zoonose-Monitorings 2009 wurde der österreichische Schaf-, Rind- und Kalbbestand stichprobenartig auf die Besiedelung mit VTEC untersucht. Mit Hilfe der Analyseverfahren Objektträgeragglutination von lebenden Kulturen, O-Serotypisierung von gekochten Kulturen und H-Serotypisierung von formalinfixierten Kulturen erfolgte die Serotypisierung der Isolate auf Basis einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Während bei knapp 80 % des gesamten Probenkollektivs der O:H-Serotyp bestimmt werden konnte, konnten mit den eingesetzten Methoden, rund 20 % der Isolate keiner definitiven O- und/oder H-Serogruppe zugeordnet werden. Zur Einschätzung des Virulenzpotentials der einzelnen VTEC-Stämme wurden die Ergebnisse der Serotypisierung mit Geno- und Phänotypisierungsresultaten verglichen.

Die Etablierung und Methodenoptimierung der eingesetzten Serotypisierungsverfahren erfolgte im Zuge der durchgeführten Untersuchungen. Das Prä-Screening mittels Objektträgeragglutination von lebenden Kulturen erwies sich, aufgrund mangelnder Spezifität, für Isolate tierischer Herkunft als ungeeignet.

XVI.

Comparative analyses of Genomic O Island (OI) 122 in LEE positive Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) from cattle

Katrin Heidemanns¹, Marcel Nordhoff², Torsten Semmler¹, Erhard Tietze³,
Angelika Fruth³ and Lothar H. Wieler¹

¹Institute of Microbiology and Epizootics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany,

²Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, LA II Veterinärmedizin, Kiel, Germany

³Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany

Keywords: Genomic Island O 122, LEE positive STEC, aEPEC, cattle

Schlüsselwörter: Pathogenitätsinsel OI 122, LEE positive STEC, aEPEC, Rinder

The relationship between atypical EPEC (aEPEC) and LEE-positive Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) is currently unknown. As cattle shed both pathogens, we screened fecal samples from 1.000 slaughter cattle (7.500 *E. coli* colonies) for isolates harbouring the Locus of Enterocyte Effacement (LEE; identified by detection of *eae* and *escV*) and Shiga-toxin (*stx*). We identified aEPEC in 74 (7.4%), LEE positive-STEC in 52 samples, (5.2%) and 5 animals shed both pathogens (0,5 %).

Possession of the genomic island OI 122 is known to be associated with virulence. LEE-positive *E.coli* can harbor a complete OI 122 (*pagC*, *sen*, *efa1/lifA*, *nleB* and *ent*) or only parts of OI 122. Our analysis revealed that 8 aEPEC harboured a complete OI 122 (10.8 %), 15 an incomplete OI 122 (20.3 %) and 51 were OI 122 negative. In contrast, in LEE-positive STEC, the analysis led to a different outcome: complete OI 122 (0%), 3 strains harbored an incomplete OI 122 (5.8%) and 49 isolates were OI 122 negative (94.2%). Serotyping of LEE-positive STEC with a complete OI-122 revealed two strains sharing O177:H11 and one strain each of O157:H-, O103:H-, O121:Hn.t., while three stains were not typeable.

All strains were further tested for virulence associated genes (VAGs) like iron acquisition, toxins, and adhesins. While none of the strains with a complete OI-122 harboured the genes *astA* (toxin), *fimC* or *iha* (adhesins), 3 (2 O26:H-, 1 not typeblae) of the aEPEC isolates with an incomplete OI-122 were positive for *astA*, *hlyA* (toxins), *paa* and *iha* (adhesins).

Furthermore, in LEE-positive STEC isolates the genes *feoB* (iron acquisition) and *mat* (adhesion) were the most prevalent, whereas *hlyA* (toxin), *paa* and *efa1* (adhesins) were the most common VAGs in aEPEC. In both pathotypes the iron acquisition genes *irp2* and *fyuA*, the adhesion gene *iha* and the toxin gene *astA* were distributed equally.

These data argue against a general relationship between aEPEC and LEE-positive STEC strains from bovines, as most of the strains differed in terms of VAGs. Future work should address the question about what role the differences between aEPEC with complete OI-122 and aEPEC without complete OI-122 play in the emergence of pathogenicity.

XVII. Duplex-PCR zur Differenzierung von *Escherichia coli* und *Shigella* spp.

Melanie Pavlovic, Ulrich Busch, Ingrid Huber

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

Shigellen sind die Erreger der Shigellose. Die Übertragung erfolgt überwiegend durch direkten Kontakt von Mensch zu Mensch. Die vier bislang bekannten *Shigella*-Arten *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* und *S. sonnei* werden zwar innerhalb der Familie *Enterobacteriaceae* einer eigenen Gattung zugeordnet, jedoch aufgrund ihrer engen Verwandtschaft zu *E. coli* als ein weiterer *E. coli*-Pathotyp angesehen (Lan *et al.*, 2004). Diese enge Verwandtschaft erschwert die biochemische und serologische Differenzierung voneinander und ist die Ursache für das bisherige Fehlen eines sicheren molekular-biologischen Differenzierungsverfahrens.

Erst kürzlich identifizierten Horakova *et al.* [1] das Gen der Laktosepermease *lacY* als Differenzierungskriterium zwischen *Shigella* spp. und *E. coli*. Jedoch erwiesen sich die Primer der dort vorgestellten konventionellen PCR für *lacY* in von uns durchgeführten Tests als ungeeignet, da das Gen eines anderen, nicht näher charakterisierten Transporters ebenfalls amplifiziert wurde und Fragmente in der gesuchten Größe auch für einige Shigellen lieferte.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein Duplex-Real-Time PCR Assay zur Differenzierung von *E. coli* und *Shigella* spp. anhand der Gene der β -Glukuronidase *uidA* und der Laktosepermease *lacY* entwickelt. Während *uidA* sowohl bei *E. coli* als auch *Shigella* spp. Stämmen positive C_T -Werte liefert, wird *lacY* nur bei *E. coli* amplifiziert.

Die Duplex-Real-Time PCR wurde anhand von 86 Isolaten, darunter 16 *Shigella* spp., 3 EIEC Pathovaren und 67 andere *E. coli* Isolate getestet. Die Inklusivität der Nachweis-Methode betrug 100%. *UidA* wurde bei allen 86 Stämmen, *lacY* bei allen 70 *E. coli* Isolaten, aber keinem der getesteten *Shigella* spp.- Stämmen detektiert.

XVIII.**Verbreitung von Typ III Effektorgenen pathogener *Escherichia coli* aus humanen, tierischen sowie Lebensmittelproben unter phylogenetischen Aspekten**

Kristina Kreuzburg¹, Barbara Middendorf², Alexander Mellmann², Tatjana Martaler¹, Christina Holz², Ralph Fischer², Angelika Fruth³, Helge Karch², und Herbert Schmidt¹

¹Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittel-mikrobiologie, Universität Hohenheim, Stuttgart

²Institut für Hygiene am Universitätsklinikum Münster

³Robert Koch-Institut, Wernigerode

Mit Hilfe eines Typ III Sekretionssystems (T3SS) sind Shiga Toxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) und enteropathogene *E. coli* (EPEC) in der Lage, Effektorproteine direkt in eukaryotische Zellen zu translozieren. Alle Komponenten des T3SS und mindestens sieben Typ III Effektoren werden von einer chromosomalen Pathogenitätsinsel, dem „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) kodiert. Die Gene weiterer über 20 Effektorfamilien, die in unterschiedlicher Form zur Pathogenität beitragen, treten insbesondere in Assoziation mit Phagen-DNA im Genom pathogener *E. coli* auf.

In 136 STEC und EPEC Isolaten 29 unterschiedlicher Serogruppen wurde die Verbreitung von drei LEE-kodierten und 16 nicht-LEE-kodierten Typ III Effektorgenen untersucht. Die phylogenetische Analyse der Stämme aus Risikolebensmitteln, Tieren, asymptomatischen Trägern und Patienten erfolgte mittels Multilokus Sequenz Typisierung (MLST). Die Anwesenheit von Typ III Effektorgenen, sowie die Subtypisierung von *eae* und *stx*, wurde mit Hilfe von PCR, DNA-Sequenzierung, Dot Blot und Southern Blot Hybridisierung untersucht.

In 31 Human- und Lebensmittelisolaten waren weder LEE-Gene noch die analysierten Typ III Effektorgene nachweisbar. Dagegen waren alle drei analysierten LEE-kodierten Effektorgene in 101 Isolaten vorhanden. Vier Effektorgen-positive Stämme besaßen keinen oder nur Teile des LEE. Über 85% der Effektorgen-positiven Stämme trugen *nleA*, *nleC*, *nleF*, *nleH1-2* und *espJ*. Dagegen waren *nleD* und *ospG* nur selten nachweisbar. Die Gesamtanzahl der analysierten Typ III Effektorgene pro Stamm variierte von acht bis 18. Mehr als 12 nicht-LEE-kodierte Effektorgene wiesen dabei ausschließlich Stämme der Serogruppe O49, sowie Isolate der klinisch relevanten Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 auf. Die Einordnung der Stämme in verschiedene Cluster mittels MLST zeigte ein relativ einheitliches Verteilungsmuster der Typ III Effektorgene innerhalb nah verwandter Gruppen.

Bei der Analyse der Virulenzgenverbreitung in verschiedenen evolutionären Linien pathogener *E. coli* konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Effektorgenen und schwerwiegenden Krankheitsbildern beobachtet werden. Dies zeigt die Schwierigkeiten einer Risikoeinschätzung von STEC-Isolaten unterschiedlicher Herkunft anhand des Vorhandenseins bestimmter Typ III Effektorgene auf.

XIX. Untersuchung differentieller Proteinexpression enterohämorrhagischer *E. coli* mittels 2D- Gelelektrophorese

Sabrina Polzin, Ines Elsenhans und Herbert Schmidt

Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittel-
mikrobiologie, Universität Hohenheim, Stuttgart

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* sind wichtige Erreger bakterieller Zoonosen. Sie werden typischerweise vom Nutztier über das Lebensmittel auf den Menschen übertragen. Die unterschiedliche Verfügbarkeit von Nährstoffen in der Umwelt (Lebensmittel) und im Wirt (Gastrointestinaltrakt) können verschiedene Stoffwechselwege und virulenzassoziierte Regulons in EHEC induzieren. Diese Mechanismen sind jedoch unzureichend beschrieben.

In Rahmen der hier vorgestellten Forschungsarbeiten wird das differentiell exprimierte Proteom der EHEC als Antwort auf verschiedene Umwelt- und Wirtsbedingungen, wie z.B. Wachstum in Medien, die das Milieu in Dünn- (SIEM) und Dickdarm simulieren (SCEM), unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen analysiert. Hierbei soll untersucht werden, wie essentielle metabolische Systeme (z.B. heterotrophe Kohlenstoff-Ernährung) der EHEC auf spezifische Umweltbedingungen reagieren und wie dies mit der Pathogenität und der Expression von Virulenzfaktoren vernetzt ist. Im Besonderen interessiert uns die Regulation solcher Determinanten, welche die ersten Schritte der Aufnahme und Infektion erleichtern (z.B. Expression von Fimbrien).

Differenziell exprimierte cytosolische Proteine wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese getrennt, mit der Gelanalysesoftware Delta2D (Decodon) evaluiert und durch MALDI-TOF identifiziert. Erste Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass unter den experimentellen Bedingungen neben wichtigen Stoffwechselfunktionen auch Virulenzfaktoren verstärkt gebildet werden.

XX. fliC types of clinically important non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*

Wenlan Zhang, Martina Bielaszewska, Franziska Stoewe, and Helge Karch
Institute of Hygiene, University of Münster

Keywords: non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*, fliC typing

A precise identification of the complete (O:H) serotype of a Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strain isolated from a patient is crucial for epidemiological investigations such as the identification of the reservoir, source of the infection and mode of transmission. However, in total 228 of 345 (66.1%) non-O157 STEC strains isolated in our laboratory from patients with hemolytic uremic syndrome (HUS) or diarrhea and belonging to serogroups O26, O91, O111, and O145 were non-motile (NM), making impossible to perform complete classical serotyping. To determine the H types of these strains, we characterized their *fliC* genes (encoding the flagellin-encoding subunit) using restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and/or sequencing. These analyses showed that all STEC O26:NM harbored *fliCH11*, the STEC O91:NM possessed *fliCH14*, and the STEC O111:NM contained *fliCH8*. In contrast, STEC O145:NM belonged to two different *fliC* genotypes, either *fliCH28* (frequently) or *fliCH25* (rarely). The *fliC* diversity in non-O157 STEC strains enables the molecular serotyping of these emerging pathogens and contributes to understanding of their clinical importance and epidemiology. Using STEC O111 as an example, we demonstrate that integration of insertion sequence elements into the *fliC* gene is one possible reason for the *fliC* non-expression and thus the strain's non-motility.

1. Mellmann et al., Emerg. Infect Dis. 2008, 14:1287-1290.

XXI.**Expression von Shiga Toxin-Rezeptoren in humanen Karzinomzelllinien der Bauchspeicheldrüse**

Wiebke Storck¹, Petra Hoffmann¹, Nadine Brandt¹, Jörg Haier², Michael Mormann³, Helga Karch¹ und Johannes Müthing¹

¹Institut für Hygiene, Universität Münster

²Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Universitätsklinikum Münster

³Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Münster

Keywords: Stx, Globotriaosylceramid, Pankreas, Massenspektrometrie

Shiga Toxine (Stx) gehören zur Familie der AB₅-Toxine und bestehen aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit und einem Pentamer aus identischen B-Untereinheiten. Über das B-Pentamer bindet das Holotoxin mit hoher Affinität an seinen Rezeptor, das neutrale Glykosphingolipid (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer). Es wurde von uns bereits gezeigt, dass Pankreaskarzinome im Vergleich zu gesundem Gewebe eine erhöhte Expression von Gb3Cer aufweisen [1]. Um zukünftig ein Tiermodell für Therapieansätze entwickeln zu können, wurden Pankreaskarzinomzelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Primärtumoren und Metastasen) auf ihre Expression des Stx-Rezeptors Gb3Cer untersucht.

Mit Hilfe eines Kombinationsverfahrens bestehend aus Dünnschichtchromatographie, Immundetektion und Massenspektrometrie wurden sowohl die Gb3Cer-Expressionsprofile als auch die Gb3Cer-Feinstrukturen pankreatischer Karzinomzelllinien ermittelt. Die GSL wurden aus den Zellen extrahiert und die neutralen GSL anschließend über Anionenaustauscherchromatographie isoliert. Nach Immundetektion der verschiedenen Gb3Cer-Varianten mit einem Gb3Cer-spezifischen polyklonalen Antikörper auf der DC-Platte wurden diese aus dem Kieselgel extrahiert und anschließend mit Hilfe der Nano-Elektrospray-Ionisations-Quadrupol Flugzeit Massenspektrometrie strukturell charakterisiert. Es konnte als erstes gezeigt werden, dass die untersuchten Zelllinien alle den Stx-Rezeptor Gb3Cer exprimieren. Die anschließenden massenspektrometrischen Messungen ergaben eine hohe Heterogenität der verschiedenen Gb3Cer-Varianten hinsichtlich ihrer Fettsäuren im Ceramidteil. Während Acylketten von C16 bis C24 bestimmt werden konnten, besaßen alle Gb3Cer-Spezies einen konstanten Sphingosin (d18:1)-Anteil. Derartige Fettsäureheterogenitäten sind von Bedeutung, da diesen eine biologische Funktion bezüglich des retrograden Transportes von Stx-Gb3Cer-Komplexen zum intrazellulären Wirkort und somit der Zytotoxizität von Stx zugeschrieben wird.

Die vorliegenden Daten legen das zurzeit noch visionäre Konzept einer Tumorthherapie mit Stx nahe, da aufgrund der hohen Expression in Pankreaskarzinomen und deren Metastasen Gb3Cer als vielversprechende Zielstruktur für Stx als potentielles Antitumormittel dienen könnte.

[1] 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(8):e6813.

XXII. Verbreitung der Gene des Immunglobulin-bindenden Proteins EibG und Expression unterschiedlicher Phänotypen bei Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*

V. Merkel, B. Ohder, M. Bielaszewska, W. Zhang, N. Brandt, J. Müthing, H. Karch, A. Mellmann

Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

Keywords: STEC, EibG, Allelvariation, MLST

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) stellen eine heterogene Gruppe von Bakterien dar, die beim Menschen Diarrhö und das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS), die häufigste Ursache für das Nierenversagen bei Kindern, verursachen können. Neben der Serogruppe O157, die weltweit verbreitet ist, gibt es auch mehrere non-O157-Serogruppen, die zunehmend bei humanen Erkrankungen nachgewiesen werden.

Einige STEC-Stämme exprimieren Proteine der Eib-Familie (*E. coli* Immunglobulin-bindende Proteine): EibA, C, D, E, F und G, die einzeln oder in verschiedenen Kombinationen innerhalb eines Stammes vorkommen können. Diese binden an den konstanten Teil der Immunglobuline, das Fc-Fragment, und ermöglichen den Bakterien, der Immunantwort des Menschen zu entkommen. Zudem soll EibG für die Adhäsion von Bakterien an humane Epithelzellen und die Ausbildung von kettenförmigen Agglomeraten verantwortlich sein.

In dieser Studie wurde zunächst die Verbreitung des *eibG*-Gens innerhalb eines weiten STEC-Spektrums mittels PCR untersucht. Außerdem wurde die Variabilität der *eibG*-Gene durch Sequenzierung analysiert und deren Phylogenie bestimmt. Insgesamt wurden 440 STEC-Stämme mit 116 unterschiedlichen Serotypen analysiert. 37 der 257 *eae*-negativen, aber keiner der 183 *eae*-positiven STEC-Stämme (13 Serotypen) waren *eibG*-positiv. Weiterhin wurde der genomische Hintergrund der *eibG*-positiven STEC mittels Multilocus Sequenztypisierung (MLST) charakterisiert. Insgesamt wurden hier 7 verschiedene Sequenztypen detektiert.

Um die für *eibG*-positiven STEC-Stämme charakteristische Kettenbildung zu überprüfen, wurden Stämme mit verschiedenen *eibG*-Allelen in Adhäsionstests mit Darmepithelzellen untersucht. Durch Blockierung von EibG und dem daraufhin folgenden Verlust der Fähigkeit, Ketten auszubilden, wurde die Funktion von EibG bei der Kettenbildung überprüft. Weitere Klonierungsexperimente sollen diesen Befund bestätigen und weiteren Aufschluss über die Funktionsweise von EibG geben.

XXIII. In vivo-Evolution und Genomsequenzen enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) O26:H11 und O145:H28

Stefan Bletz¹, Jörg Schuldes², Elzbieta Brzuszkiewicz², Ariane Liebchen³, M. Alexander Schmidt³, Rolf Daniel², Gerhard Gottschalk², Barbara Middendorf¹, Martina Bielaszewska¹, Wenlan Zhang¹, Helge Karch¹, Alexander Mellmann¹

¹Institut für Hygiene und Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Universitätsklinikum Münster

²Göttingen Genomics Laboratory, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen

³Institut für Infektiologie, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Universität Münster

Keywords: STEC, EibG, Allelvariation, MLST

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) stellen eine hoch virulente Untergruppe von darmpathogenen *E. coli* dar, die wässrige/blutige Durchfälle, eine hämorrhagische Kolitis und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen können. EHEC O157:H7 ist der weltweit am häufigsten isolierte und mit HUS assoziierte Serotyp, wohingegen in Deutschland häufig EHEC anderer Serotypen bei HUS-Patienten nachgewiesen werden. Hierzu zählen u. a. EHEC der Serotypen O26:H11 und O145:H28. Molekulare und zelluläre Analysen haben gezeigt, dass neben dem Shiga Toxin zahlreiche andere Virulenzfaktoren bei Wirt-Erreger-Interaktionen eine Rolle spielen. Zudem konnten wir nachweisen, dass sich EHEC im Infektionsverlauf von nur wenigen Tagen durch Verlust und/oder Aufnahme von genetischen Elementen verändern können. Da nur wenig über die Genome dieser Serotypen bekannt ist und in diesen Serotypen ebenfalls Veränderungen im Infektionsverlauf auftraten, untersuchten wir jeweils ein Paar (Erst- und Folgeisolat im Infektionsverlauf nach 8 Tagen) dieser Serotypen mittels Gesamtgenom-Microarrayanalysen und -sequenzierungen. Hierbei zeigten die Microarrayanalysen der O26:H11-Isolate einen Verlust von 25 Genen während der Infektion. Die Genverluste betrafen hauptsächlich die Genominsel OI#45, in der auch das Shiga Toxin-Gen inseriert ist. Diese Ergebnisse konnten mit der Gesamtgenomsequenzierung bestätigt und ergänzt werden. Weiterhin konnten wir für das O26:H11-Erstisolat eine Chromosomgröße von 5,56 Mb bestimmen; für das O145:H28-Erstisolat liegen derzeit in 10 Contigs 5,2 Mb Sequenzinformationen vor. Darüber hinaus konnte jeweils ein Plasmid in beiden Erstisolaten nachgewiesen werden, das Ähnlichkeit zu den Plasmiden pSOF157 (EHEC O157:H-, Stamm 493/89) und pO26 (EHEC O26:H11, Stamm 11368) aufwies. Der Vergleich des O26:H11-Chromosoms mit der kürzlich veröffentlichten O26:H11-Sequenz (Stamm 11368) ergab Ähnlichkeiten von 90%; der O145:H28 Stamm zeigte 81% Sequenzhomologie zum EHEC O157:H7 EDL933. Insgesamt konnten wir 5159 ORFs im O26:H11-Erstisolat identifizieren; in den bereits fertig gestellten 10 Contigs des O145:H28-Erstisolats, die mindestens 50 kb groß waren, konnten 4163 ORFs detektiert werden. Nach Lückenschließung werden wir zukünftig im Detail Veränderungen im Infektionsverlauf und andere Serotypen vergleichend untersuchen, um Einblicke in die Evolution von non-O157 EHEC zu erhalten.

Weiterhin werden wir die gemeinsamen Virulenzeigenschaften charakterisieren und neue Ziele für die Diagnostik und Therapie von EHEC-Infektionen definieren.

XXIV.**Reduktion der Oberflächenexpression der Komplement-Regulatoren CD46, CD55 und CD59 auf Tubulusepithelzellen durch Shigatoxin 2**

Silvia Ehrlenbach, Reinhard Würzner, Dorothea Orth

Sektion für Hygiene & Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität Innsbruck

Keywords: EHEC, Shigatoxin 2, Komplement; EHEC; Shiga toxin 2, Complement

Shigatoxin 2 (Stx2) zählt zu den wichtigsten Virulenzfaktoren enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC). Infektionen mit diesen Bakterien gelten als Hauptursache für das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS).

Die zellständigen Komplementproteine CD46 (MCP), CD55 (DAF) und CD59 sind als Regulatoren der Komplementaktivität unter anderem als Cofaktor bei der Spaltung membranständiger Komplementfaktoren, der Deaktivierung von C3- und C5-Konvertasen sowie der Inhibierung des Membranangriffskomplexes (MAC) beteiligt

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob Stx2 die Expression von CD46, CD55 und CD59 auf Nierenzellen verändert, weil diese beim HUS besonders betroffen sind.

Tubulusepithelzellen (HK2 Zellen) zeigen nach Inkubation mit aufgereinigtem Stx2 eine deutliche verminderte Expression von CD46 und CD55 sowie eine leicht verminderte Expression von CD59 mittels FACS-Analysen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Stx2 schützende Komplementregulatoren auf der Zelle vermindert und somit die Zelle vermutlich vulnerabler gegen den Angriff des Komplementsystems wird.

XXV. Das molekulare Arrangement von Glykosphingolipid- Rezeptoren in lipid rafts beeinflusst die biologische Wirkung von Shiga Toxinen

Josefine Betz, Martina Bielaszewska, Dagmar Mense, Helge Karch, Alexander W. Friedrich
und Johannes Müthing

Institut für Hygiene, Universität Münster

Keywords: Endothelzellen, Globotriaosylceramid, retrograder Transport

Shiga Toxin (Stx)-produzierende *Escherichia coli* (STEC) verursachen intestinale Infektionen wie z.B. eine Gastroenteritis aber auch schwerere Erkrankungen, die zur Manifestation des lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) führen können. Glykosphingolipide (GSL) der Globo-Serie stellen die Stx-Rezeptoren dar, die als Target-Strukturen fungieren und insbesondere durch Schädigung mikrovaskulärer Endothelzellen für Stx-vermittelte Niereninsuffizienzen verantwortlich sind [1]. GSL sind, neben Cholesterin, Sphingomyelin und spezifischen Membranproteinen, vorrangig in Mikrodomänen der Plasmamembran, den sogenannten *lipid rafts*, lokalisiert. Nach Bindung und anschließender Rezeptor-vermittelter Endozytose inhibieren Stx die Proteinbiosynthese an den Ribosomen, was letztendlich zum Zelltod führt. Es gibt Hinweise darauf, dass nur mit Mikrodomänen assoziierte GSL-Rezeptoren in der Lage sind, Exotoxine effizient zum subzellulären Zielort zu transportieren. Auf Grund fehlender Daten zur GSL-Komposition von Mikrodomänen sind die molekularen Mechanismen von Stx-Bindung und -Internalisierung noch weitgehend unbekannt.

Aus diesem Grund wurde von uns die qualitative und quantitative Verteilung von Stx-Rezeptoren in *lipid rafts* von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen untersucht. Mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden spezifische flotierende Fraktionen der Plasmamembran isoliert, in welchen neutrale GSL der Globo-Serie (=Stx-Rezeptoren) mit dünnschichtchromatographischen und immunchemischen Techniken nachgewiesen wurden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die untersuchten mikro- und makrovaskulären Endothelzellen unterschiedliche Typen von Mikrodomänen besitzen. Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte außerdem die Kolokalisation von Stx-Rezeptoren mit charakteristischen, *lipid raft*-assoziierten Marker-Proteinen dargestellt werden. Des Weiteren wurde demonstriert, dass es einen Zusammenhang zwischen der Sensitivität der Zellen gegenüber Stx und der Stabilität der Mikrodomänen gibt. Offenbar besitzen die sensitiveren mikrovaskulären Zellen robustere *lipid rafts* als die weniger sensitiven makrovaskulären Endothelzellen. Unterstützung für diese Hypothese lieferten Untersuchungen zum subzellulären Transport von Stx, wobei die mikrovaskulären Endothelzellen eine wesentlich höhere Stx-Internalisierungsrate aufwiesen als die weniger sensitiven makrovaskulären Zellen. Wir sind davon überzeugt, dass weitere detaillierte Analysen der in der Plasmamembran lokalisierten Mikrodomänen von Endothelzellen uns helfen werden, die initialen Stx-Rezeptor-Interaktionen besser zu verstehen, um darauf aufbauend einen Beitrag zur Entwicklung von Therapie-Ansätzen für STEC-Infektionen leisten zu können.

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

Referenten und Moderatorenverzeichnis

A

B

- Baljer, Prof. Dr. Dr. habil Georg
Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen
- Barth, Dr. Stefanie
Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen
- Bauerfeind, Prof. Dr. Rolf
Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen
- Bauwens, Andreas
Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster
- Benninger, Gerlinde
Universität Münster
Nationale Forschungsplattform für Zoonosen
Institut für Molekulare Virologie
Von-Esmarch-Str. 56, 48149 Münster
- Betz, Josefine
Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Physik und Biophysik
Robert-Koch-Str. 31, 48149 Münster
- Beutin, PD Dr. Lothar
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
Nationales Referenzlabor für Escherichia coli (NRL-E.coli)
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin
- Bielaszewska, M.D. PhD. Martina
Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster
- Bletz, Stefan
Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene und Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF)
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster
- Busch, Dr. Ulrich
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

C

- Creuzburg, Dr. Kristina
Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie
Garbenstr. 28, 70599 Stuttgart

D

E

Ehrlenbach, Silvia
Universität Innsbruck
Sektion Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Fritz-Pregl-Str. 3, A-6020 Innsbruck

F

Fink, Sabrina
Österreichische Agentur für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit GmbH
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

Friedrich, PD. Dr. Alexander
Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Fröhlich, Dr. Julia
Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen

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

G

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

Guenther, Dr. Sebastian
Freie Universität Berlin
Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Philippstraße 13, 10115 Berlin

H

Hächler, PD Dr. Herbert
Nationales Zentrum für enteropathogene Bakterien (NENT)
Zentrum für Labormedizin, Kantonsspital Luzern
CH-6000 Luzern 16

Heidemanns, Dr. Katrin
Freie Universität Berlin
Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Philippstr. 13, 10115 Berlin

Hingst, Prof. Dr. Volker
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

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

I

J

Jenke, Christian
Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene
Konsiliarlabor für Hämolytisch Urämisches Syndrom
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

K

Käppeli, Ursula

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

Karch, Prof. Dr. Helge

Universitätsklinikum Münster
Institut für Hygiene und Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF)
Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Kirchner, Dr. Markus

Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (NLGA)
Roesebeckstr. 4-6, 30449 Hannover

Kuczus, PD Dr. Thorsten

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

L

Leopoldseder, Dr. Sonja

Ludwig-Maximilians-Universität München
Max von Pettenkofer-Institut
Pettenkoferstr. 9a, 80336 München

Liebl, Prof. Dr. Bernhard

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

Loos, Daniela

Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen

M

Martin, Annett

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
Epidemiologie, Biometrie und mathematische Modellierung
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Menge, PD Dr. Christian

Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Frankfurter Str. 85-89, 35392 Giessen

Menrath, Andrea

Christian-Albrechts-Universität Kiel
Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät
Institut für Tierzucht und Tierhaltung
Olshausenstraße 40, 24098 Kiel

Merkel, Viktor

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

Messelhäußer, Dr. Ute

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Dienststellen Erlangen und Oberschleißheim

Müthing, Prof. Dr. Johannes

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

N

Neubauer, Sabine

Österreichische Agentur für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit GmbH
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

Nielsen, MD Stine

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

O

Orth, Dr. Dorothea

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

P

Pavlovic, Dr. Melanie

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

Polzin, Sabrina

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

Q

R

Rosales, MD Alejandra

Medizinische Universität Innsbruck
Forschungslabor Pädiatrie 1
Anichstrasse 35, 6020, Innsbruck

S

Schlager, Dr. Sabine

Österreichische Agentur für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit GmbH
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

Schleuter, Dr. Gabriele

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)
Veterinärinstitut Oldenburg

Schmidt, Prof. Dr. M. Alexander

Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Institut für Infektiologie
Von-Esmarch-Str. 56, 48149 Münster

Schmidt, Prof. Dr. Herbert

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

Schütz, Michael

Hyglos GmbH
Joseph-Engert-Str. 11, 93053 Regensburg

Sing, PD. Dr. Dr. Andreas

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim Stark, Prof. Dr. Klaus
Robert Koch-Institut
Abteilung für Infektionsepidemiologie
DGZ-Ring 1, 13086 Berlin

Stephan, Prof. Dr. Roger
Universität Zürich, Institut für Lebensmittelsicherheit und Hygiene
Winterthurerstr. 272, DH-8057 Zürich

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

Stüber, Dr. Elisabeth
Ludwig-Maximilians-Universität München
Tierärztliche Fakultät
Lehrstuhl für Lebensmittelhygiene, 85764 Oberschleißheim

I

U

V

W

Werber, Dr. Dirk
Robert Koch-Institut
Abteilung für Infektionsepidemiologie
DGZ-Ring 1, 13086 Berlin

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

Wieler, Prof. Dr. Lothar
Freie Universität Berlin
Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Philippstraße 13, 10115 Berlin

Wildner, Prof. Dr. Manfred
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Würzner, Prof. Dr. Reinhard
Österreichisches Referenzzentrum für EHEC am Department für Hygiene
Mikrobiologie und Sozialmedizin
Innsbruck

X

Y

Z

Zapf, Dr. Andreas
Präsident Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Eggenreuther Weg 43
91058 Erlangen

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

Zimmerhackl, Prof. Dr. Lothar
Medizinische Universität Innsbruck
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde
Anichstr. 35, 6020 Innsbruck



91058 Erlangen
Eggenreuther Weg 43
Telefon: 09131 764-0



85764 Oberschleißheim
Veterinärstraße 2
Telefon: 089 31560-0



97082 Würzburg
Luitpoldstraße 1
Telefon: 0931 41993-0



80538 München
Pfarrstraße 3
Telefon: 089 2184-0

www.lgl.bayern.de

**Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit**
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131 764-0
Telefax: 09131 764-102

E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

Gestaltung & Druck: KAISER MEDIEN GmbH, Nürnberg

Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier

ISBN 978-3-942018-11-1 Druck Ausgabe

ISBN 978-3-942018-12-8 Internet Ausgabe