

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

---

**UNTERSUCHUNGEN ZUR PHYLOGENESE VON SHIGATOXIN-BILDENDEN  
*ESCHERICHIA COLI* DER SEROGRUPPE O118**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Eingereicht von  
**Barbara Weniger**

Gießen 2001

Aus dem Institut für Hygiene und  
Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. L.H. Wieler

**UNTERSUCHUNGEN ZUR PHYLOGENESE VON SHIGATOXIN-BILDENDEN  
*ESCHERICHIA COLI* DER SEROGRUPPE O118**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Barbara Weniger**  
Tierärztin aus Lippstadt

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L.H. Wieler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Rügenapf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2001

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>III</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Schrifttum</b>	<b>2</b>
<b>2.1.</b>	<b>Definitionen genetischer Ereignisse</b>	<b>3</b>
<b>2.2.</b>	<b>Klonales Modell von Populationsstrukturen</b>	<b>5</b>
<b>2.3.</b>	<b>Genetische Variation und Rekombination</b>	<b>9</b>
<b>2.4.</b>	<b>Darmpathogene <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)</b>	<b>16</b>
<b>2.5.</b>	<b>Definierung klonaler Gruppen</b>	<b>24</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
<b>3.1.</b>	<b>Herkunft der Teststämme</b>	<b>32</b>
<b>3.2.</b>	<b>Angewandte Untersuchungsmethoden</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1.1.</b>	<b>Agarosegelelektrophorese</b>	<b>42</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>Hämolyse</b>	<b>42</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>DNS-DNS-Hybridisierungsverfahren</b>	<b>42</b>
<b>3.2.3.1.</b>	<b>Herstellung von Gensonden</b>	<b>42</b>
<b>3.2.3.2.</b>	<b>Dot-Blot</b>	<b>43</b>
<b>3.2.3.3.</b>	<b>DNS-DNS-Hybridisierung</b>	<b>44</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)</b>	<b>45</b>
<b>3.3.</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	<b>49</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>Nährmedien zur Anzucht von Bakterien</b>	<b>49</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>Reagenzien für DNS-Methoden</b>	<b>49</b>
<b>3.3.3.</b>	<b>Verwendete Geräte</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
<b>4.1.</b>	<b>Charakterisierung Shigatoxin-bildender <i>E.coli</i>-Feldstämme der Serogruppe O118</b>	<b>56</b>

## II

4.1.1.	Nachweis der Shigatoxin-Gene ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> )	56
4.1.2.	Nachweis des EHEC-Hämolysins (Hly <sub>EHEC</sub> )	59
4.1.3.	Nachweis des <i>E.coli</i> "attaching and effacing"-Gens ( <i>eae</i> )	60
4.1.4.	Nachweis der sezernierten Protease (EspP)	61
4.1.5.	Überprüfung der Sensitivität der angewandten PCR durch DNS-DNS-Hybridisierung	63
4.1.6.	Zusammenfassende Darstellung der Virulenztypisierung	63
4.2.	Untersuchungen zur klonalen Verwandtschaft von STEC der Serovar O118	75
4.2.1.	Klonale Analyse der STEC-Stämme vom Tier	78
4.2.2.	Klonale Analyse der STEC-Stämme vom Menschen	82
4.2.3.	Vergleichende klonale Analyse der STEC-Stämme von Mensch und Rind	86
4.2.4.	Klonale Analyse der STEC-Stämme vom Rind (Bayern) und vom Menschen	91
4.2.5.	Nachweis des <i>fliC</i> -Gens	93
5.	Diskussion	97
6.	Zusammenfassung	106
7.	Summary	109
8.	Literaturverzeichnis	112
9.	Danksagung	129

## Verzeichnis der Abkürzungen

AAF/I	<u>agg</u> regative <u>ad</u> herence <u>fim</u> briae I
ADP	<u>A</u> denosin- <u>Di</u> - <u>P</u> hosphat
A/E	<u>att</u> aching- <u>and</u> - <u>eff</u> acing
AIDA-I	<u>ad</u> hesin <u>inv</u> olved in <u>diff</u> use <u>ad</u> herence I
BFP	<u>B</u> undle- <u>f</u> orming <u>p</u> ili
<i>bfpA</i>	Strukturgen der <u>B</u> undle- <u>f</u> orming <u>p</u> ili <u>A</u>
bp	<u>B</u> asenpaare
Ca <sup>++</sup>	<u>C</u> alciumionen
cAMP	<u>cy</u> clisches 3',5'- <u>A</u> denosin <u>mon</u> ophosphat`
CFA	<u>col</u> onization <u>f</u> actor <u>an</u> tigen
cGMP	<u>cy</u> clisches 3',5'- <u>G</u> uanyl <u>mon</u> ophosphat
CHEF-PAGE	<u>C</u> lamped <u>H</u> omogeneous <u>E</u> lectrical <u>F</u> ield- <u>P</u> oly <u>A</u> crylamid <u>G</u> el <u>E</u> lectrophorese
Cl <sup>-</sup>	<u>C</u> hloridionen
CNF	<u>Z</u> ytonekrose- <u>F</u> aktor
CT	<u>C</u> holera <u>to</u> xin
D	<u>D</u> urchfall
Da	<u>D</u> alton
DAEC	<u>diff</u> us <u>adh</u> ärente <u>E. coli</u>
DEC	<u>Di</u> arrheagenic <u>E. coli</u>
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
<i>eae</i>	Strukturgen des Intimin ( <u>E. coli</u> <u>att</u> aching- <u>and</u> - <u>eff</u> acing-Gen)
EAggEC	<u>ent</u> ero <u>agg</u> regative <u>E. coli</u>
EAST	Hitze- <u>st</u> abiles Enterotoxin der <u>EAggEC</u>
EHEC	<u>ent</u> ero <u>h</u> ämorrhagische <u>E. coli</u>
EIEC	<u>ent</u> ero <u>in</u> vasive <u>E. coli</u>
EPEC	<u>ent</u> eropathogene <u>E. coli</u>
EspP	<u>E. coli</u> <u>sez</u> ernierte <u>P</u> rotease <u>P</u>

## IV

ET	<u>E</u> lectrophoretic <u>T</u> ype
ETEC	<u>e</u> nterotoxische <u>E. coli</u>
F	<u>F</u> imbrienantigen
<i>fliC</i>	Strukturgen, das für das H-Antigen kodiert
Gb3	<u>G</u> lobotriaosylzeramid <u>3</u>
Gb4	<u>G</u> lobotetraosylzeramid <u>4</u>
HC	<u>H</u> ämorrhagische <u>K</u> olitis
HIV	<u>h</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus
Hly	<u>H</u> ämolysin
HUS	<u>H</u> ämolytisch- <u>U</u> rämisches- <u>S</u> yndrom
kb	<u>K</u> ilobasen
kDa	<u>K</u> ilodalton
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
LEE	<u>l</u> ocus of <u>e</u> nterocyte <u>e</u> ffacement
LT	Hitze-labiles Enterotoxin
MDa	<u>M</u> egadalton
MLEE	<u>M</u> ultilokus- <u>E</u> nzyme <u>e</u> lektrophorese
MLST	<u>M</u> ultilokus- <u>S</u> equenz <u>t</u> yping
Na <sup>+</sup>	<u>N</u> atriumionen
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> hlorid
NRW	<u>N</u> ord <u>r</u> hein <u>w</u> estfalen
NSA	<u>N</u> iedersachsen
NTEC	<u>n</u> ekrotoxische <u>E. coli</u>
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
OMP	äußeres <u>M</u> embran- <u>P</u> rotein
PCR	<u>P</u> olymerase- <u>K</u> etten <u>r</u> eaktion
PFGE	<u>P</u> uls <u>f</u> eld- <u>G</u> e <u>l</u> e <u>e</u> ktrophorese
<i>pheU</i>	Strukturgen der tRNA für <u>P</u> henylalanin
RDEC	<u>r</u> abbit <u>d</u> iarrheagenic <u>E. coli</u>
<i>rec</i>	Gen zur Regulation der <u>R</u> ekombination und DNS-Reparatur
<i>rfb</i>	Strukturgen für Proteine, involviert in der O-Antigensynthese



## V

Rhl.-Pflz	<u>R</u> hein <u>l</u> and- <u>P</u> fal <u>z</u>
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
Schlesw.-H.	<u>S</u> chles <u>w</u> ig- <u>H</u> olstein
<i>selC</i>	Strukturgen der tRNA für Selenocystein
<i>sen</i>	<u>S</u> higella <u>E</u> nterotoxingen
ST	Hitze- <u>s</u> tabiles Enteroto <u>x</u> in
STEC	<u>S</u> higato <u>x</u> in-bildende <u>E</u> . <u>c</u> oli
<i>stx</i>	Strukturgen des <u>S</u> higato <u>x</u> ins
Stx	<u>S</u> higato <u>x</u> in
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
tRNS	<u>T</u> ransfer- <u>R</u> ibonukleinsäure
TTP	<u>T</u> hrombotisch- <u>T</u> hrombozytopenische- <u>P</u> urpura
UK	<u>U</u> nited <u>K</u> ingdom
UPGMA	<u>u</u> nweighted <u>p</u> air <u>g</u> roup <u>m</u> ethod <u>a</u> nalysis
UTI	<u>u</u> rinary <u>t</u> ract <u>i</u> nfection

## 1. Einleitung

Die Bedeutung der Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) als pathogene Keime für den Menschen ist seit langem bekannt. Besonders Stämme der Serovare O157:H7, O111:H-, O55:H7 und O26:H11 sind die häufigsten Auslöser bakterieller Infektionen, die zu den schweren Krankheitsbildern des Hämolytisch-Urämischen Syndroms (HUS), der Hämorrhagischen Kolitis (HC) sowie der Thrombotisch-Thrombozytopenischen Purpura (TTP) führen (38, 49, 55). Doch nicht nur EHEC der o.g. Serovare können für den Menschen eine pathogene Wirkung haben. So werden von humanen Patienten immer häufiger auch Stämme der Serogruppe O118 isoliert. Von dieser Serogruppe weiß man, daß sie unter den beim Rind gefundenen Isolaten in Deutschland und Belgien die höchste Prävalenz besitzt (85, 117). Diese Shigatoxin-bildenden *E.coli* (STEC) spielen jedoch als Krankheitserreger beim Rind eine untergeordnete Rolle, da sie auch von gesunden Tieren isoliert werden (46, 71, 86). Da das Rind jedoch als Hauptausscheider für STEC bekannt ist (49, 120) und der Kontakt zwischen Mensch und Rind sich nicht nur auf das Lebensmittel „Rind“ beschränkt, ist die Vermutung berechtigt, daß es sich bei den STEC um Zoonoseerreger handelt. Der kürzlich veröffentlichte Bericht von Weber et al. (105) von einem Kind, bei dem eine EHEC-Infektion mit einem O118:H16 Stamm nachgewiesen wurde und das Kontakt zu einem gesunden Kalb hatte, bei dem der gleiche Stamm gefunden wurde, bestätigt diese Vermutung. Wir nahmen diesen Fall zum Anlaß, in der folgenden Untersuchung eine klonale Analyse bei 100 O118 *E.coli*-Isolaten durchzuführen, in deren Mittelpunkt die Frage stand, ob es sich bei den beim Rind gefundenen STEC um potentielle EHEC handelt. Dies wurde durch Analyse der EHEC-typischen Virulenzfaktoren Shigatoxin (*stx*), EHEC-Hämolysin ( $Hly_{EHEC}$ ) und „attaching-and-effacing“ (*eae*)-Gen mit phäno- und genotypischen Methoden sowie der Makrorestriktion nachgewiesen.

## 2. Schrifttum

Die bakterielle Populationsgenetik ist ein relativ junges Forschungsgebiet, das sich zur Aufgabe gemacht hat, fundamentale Fragestellungen über die Entwicklungsgeschichte von Bakterienpopulationen zu beantworten. Die Spezies *E.coli* stellt in vieler Hinsicht den idealen Organismus für solche Studien dar:

Zum Einen läßt sich eine umfangreiche Variation in der Virulenz zwischen den bakteriellen Stämmen feststellen. Die natürliche *E.coli*-Population setzt sich zusammen aus harmlosen kommensalen Organismen, die im Darm leben, aus opportunistischen Pathogenen, die gelegentlich normalerweise sterile Gewebe infizieren, und aus spezialisierten Pathogenen, die spezifische Virulenzfaktoren besitzen und somit definierte Krankheitsbilder hervorrufen.

Zum Anderen wurden in den letzten 10 Jahren große Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Basis der Pathogenese von *E.coli*-Infektionen gemacht. Und schließlich sind pathogene *E.coli* weltweit mit einem vielfältigen Spektrum von humanen und animalen Krankheiten assoziiert.

Vor diesem Hintergrund werden von zahlreichen Molekularbiologen klonale Analysen durchgeführt, um die häufigsten bakteriellen Genotypen zu identifizieren und die genetische Verwandtschaft zwischen den einzelnen *E.coli*-Serogruppen zu untersuchen. Dabei tritt immer wieder eine zentrale Fragestellung auf:

**Wie beeinflussen bestimmte genetische Ereignisse wie Mutation, natürliche Selektion, Rekombination und genetic drift die genetische Variation und wie ändern sich dadurch Populationsstruktur, genomische Organisation und Evolutionsraten?**

Zur Beantwortung dieser Frage ist es sinnvoll, zunächst die oben genannten genetischen Ereignisse zu definieren.

## 2.1. Definitionen genetischer Ereignisse (87, 119)

**Allele:** Ausprägungen eines Gens, die auf homologen Chromosomen am gleichen Genort lokalisiert sind.

**Genetic drift:** Veränderungen der Genhäufigkeiten in einer Population von Generation zu Generation infolge von Zufallsabweichungen (bes. bei kleinen Populationen bemerkbar).

**Inversion:** Umkehrung eines Chromosomenfragments um  $180^\circ$  mit möglichen Veränderungen im Phänotyp.

**Konjugation:** Parasexueller Mechanismus zur Übertragung von genetischem Material unter Bildung einer Plasmabrücke zwischen einem Bakterium, das einen sog. Konjugationsfaktor (Plasmid) besitzt, und einem weiteren Bakterium. Über die Plasmabrücke (den sog. Sexualpilus) dringt ein DNS-Strang des Konjugationsfaktors in die Empfängerzelle ein, wodurch die kodierten Eigenschaften ausgeprägt werden können.

**Mosaikgenom:** Unterschiedliche Zusammensetzung des Genoms in Zellen eines Individuums oder einer Zellkultur, die von einer Ursprungszelle abstammen.

**Mutation:** Veränderung des genetischen Materials, die ohne erkennbare äußere Ursache (Spontanmutation) oder durch exogene Einflüsse entstehen kann. Je nach Ausmaß der Veränderungen werden numerische und strukturelle Chromosomaberrationen, Punkt- und Blockmutationen unterschieden. Neben dem Austausch einer Purinbase (Transition) oder Pyrimidinbase (Transversion) kann es sowohl zum Verlust (Deletion) als auch

zum Einfügen (Insertion) einzelner Basen bzw. Basensequenzen oder zum Einbau von anderen Molekülen in die DNS (Rastermutation) kommen. Das Ergebnis einer Mutation kann die Synthese eines veränderten Genprodukts hervorrufen, was eine Veränderung des Phänotypus bewirkt. Betrifft die Mutation jedoch keine wesentlichen Teile der DNS oder hat sie nur eine vernachlässigbare Auswirkung auf die Funktion eines Gens, nennt man sie eine **stille** oder **neutrale Mutation**.

**Panmixie:** Ein Paarungssystem in einer Population, in dem die gleiche Wahrscheinlichkeit für jede Partnerkombination besteht (panmiktische Population), d.h. in dem alle vorkommenden Gene hinsichtlich ihrer Kombinationsmöglichkeit völlig dem Zufall unterworfen sind.

**Rekombination:** Bildung neuer Genkombination aus genetisch verschiedenen Genomen. Die Integration erfolgt in manchen Fällen an spezifischen Stellen, in anderen zufällig. Bei Bakterien sind spezifische Gene, sog. *rec*-Gene, bekannt, die den Rekombinationsprozeß steuern. Durch Rekombination kommt es zu Änderungen im Phänotyp des betroffenen Organismus.

**Selektion:** Auslese bestimmter Genotypen oder Mutanten aus einer Population.

**Transduktion:** Übertragung eines Bruchstückes des genetischen Materials des Bakterienwirts durch Bakteriophagen. Dieses Bruchstück kann durch Rekombination in das Genom der neuen Bakterienzelle eingebaut werden und zum Gewinn einer neuen Eigenschaft führen.

**Transformation:** Übertragung von genetischen Informationen zwischen Bakterien durch Aufnahme von DNS-Bruchstücken (ist nur zwischen Bakterien verwandter Spezies möglich).

**Transposition:** Verlagerung von genetischem Material innerhalb eines Chromosoms oder Übertragung auf andere Chromosomen oder Plasmide.

Analysen natürlich vorkommender *E.coli*-Stämme haben gezeigt, daß diese Bakterien eine klonale Abstammung aufweisen. Whittam (111) hat seine Untersuchungsergebnisse in einem klonalen Modell zusammengefaßt.

## 2.2. Klonales Modell von Populationsstrukturen

Aufgrund der genetischen Struktur einer Bakterienspezies wird eine **Population** als eine Mischung aus asexuellen Zelllinien oder Bakterienklonen definiert. Ein **Klon** besteht aus einer einzigen Zelle und ihren direkten Nachkommen (111). In diesem Sinne stellt eine **klonale Linie** ein geschlossenes genetisches System dar, in dem Unterschiede durch genetische Ereignisse eintreten, die nur innerhalb einer Zelle vorkommen können wie z.B. Punktmutationen, Inversionen, Duplikationen, Deletionen oder Transpositionen. Folglich ist es nicht zwingend notwendig, daß Mitglieder eines Klons genetisch oder phänotypisch homogen sind.

Während in der Vergangenheit die genetische Identität Teil dieser Definition war, wurde mit der raschen Entwicklung von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden wie der DNS-Sequenzanalyse klar, daß klassische genetische Marker über das gesamte Chromosom verteilt sind und daß mutante Formen dieser Marker in ihrer Struktur nicht gleichförmig sein müssen (66).

Für heutige Zwecke wird der Begriff "Klon" verwendet, um Bakterienkulturen zu bezeichnen, die unabhängig voneinander aus unterschiedlichen Quellen, an unterschiedlichen Orten und ggf. zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert wurden, die jedoch so viele identische phänotypische und genetische Merkmale aufweisen, daß die wahrscheinlichste Erklärung für diese Identität ein gemeinsamer Ursprung ist (79).

In einer **klonal-strukturierten Population** stellen Genotypen die Verbreitung von Evolutionsveränderungen in einer Population dar (111). Sie können über viele Generationen hinweg persistieren und unterscheiden sich nur durch Mutationen und genetische Veränderungen, die innerhalb einzelner Bakterienzellen vorkommen. Findet keine Rekombination zwischen den Bakterienzellen statt, führt das Auftreten einer vorteilhaften Mutation zum Austausch von Zelllinien, einem Phänomen, das als **periodische Selektion** bezeichnet wird. Als Folge der periodischen Selektion wird wiederholt eine bestimmte genetische Variation, die durch Mutation und genetische Drift angehäuft wurde, eliminiert (66).

Dieses Modell, das eine asexuelle Reproduktion sowie das Ausbleiben von Rekombination zwischen einzelnen Bakterien voraussetzt, ist in seiner strikten Form unrealistisch, da bakterielle Populationen Mechanismen zum Austausch genetischer Informationen zwischen Bakterien gefunden haben, wie die bereits erwähnten Ereignisse der Transduktion, Transformation oder Konjugation. Um die Rolle der Rekombination und ihren Einfluß auf die genetische Variation und die genomische Divergenz in natürlich vorkommenden *E.coli* näher zu untersuchen, mußten deshalb weitere Modelle über Populationsstrukturen entwickelt werden.

## Klonaler Rahmen

Um Ereignisse wie den Gentransfer, die Rekombination, die periodische Selektion und die Mutation in der Evolution von *E.coli*-Populationen zu berücksichtigen, entwickelten Milkman und Bridges (65) ein Modell, in dem ein bestimmter klonaler Rahmen, d.h. ein spezifischer chromosomaler Hintergrund, durch das Vorkommen einer vorteilhaften Mutation an Häufigkeit zunimmt. Der Klon, der diese vorteilhafte Mutation trägt, breitet sich in der Population aus, ersetzt teilweise bereits bestehende Klone und erhöht insgesamt die genetische Variation der gesamten Population. Während dieser adaptierte Klon immer häufiger vorkommt und sich auch geographisch ausbreitet, kommt es gleichzeitig zu einer Akkumulation neutraler Mutationen, in deren Zuge Teile des Genoms durch Gentransfer ersetzt werden.

Der klonale Rahmen bezieht sich auf die Überbleibsel der ursprünglichen DNS-Sequenz der Gründerzelle. Seine Intaktheit hängt davon ab, wie häufig die Ereignisse Gentransfer, Rekombination, periodische Selektion und Mutation auftreten. Das Modell des klonalen Rahmens betont besonders das Auftreten einer vorteilhaften Mutation, die die Entstehung eines neuen Klons kennzeichnet. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Divergenz stärker ist, wenn ein adaptierter Klon expandiert als wenn genetisches Material dem Klon von außen zugeführt wird, was zu Mosaikgenomen führt. Die Integrität des klonalen Rahmens kann über eine lange Zeit fortbestehen, wenn die Austauschvorgänge unregelmäßig stattfinden und zudem nur kurze DNS-Segmente beteiligt sind (111).



## Nischen-spezifische Selektion

Dieses Modell einer Populationstruktur berücksichtigt die Adaptation bakterieller Subpopulationen an unterschiedliche Lebensräume und bestimmte Nischen.

Ausgehend von der Tatsache, daß Proteine und Lipopolysaccharide auf der Oberfläche von *E.coli* hoch polymorph sind (was sich in der großen Anzahl verschiedener O-, H- und K-Antigene widerspiegelt), hat Reeves (88) ein Modell entwickelt, in dem bestimmte Allele, die für spezifische Oberflächenantigene kodieren, in unterschiedlichen Nischen durch natürliche Selektion begünstigt werden.

Diese bevorzugten Allele und ihre korrespondierenden Antigene nehmen innerhalb einer bestimmten Nische an Häufigkeit zu, da sie gegenüber anderen Klonen den Vorteil einer besseren Eignung haben. Gentransfer von Organismen außerhalb der Nische hat zur Folge, daß nicht-adaptierte Allele in die Population gelangen. Ihre Anzahl bleibt jedoch gering, wenn der Gentransfer unregelmäßig stattfindet und sie im Zuge der Selektion wieder effektiv eliminiert werden.

Wenn eine vorteilhafte Mutation auftritt, ersetzt der Klon, der sie trägt, die anderen Klone in diesem Lebensraum, an den er adaptiert ist. Er ersetzt jedoch nicht die Gesamtheit aller Klone dieser Spezies. So dominieren die adaptierten klonalen Genotypen in bakteriellen Subpopulationen bestimmter Nischen. Das Ausmaß, mit dem diese Bakterien auch geographisch in andere Lebensräume streuen, bestimmt, wie häufig der adaptierte Klon in der gesamten Spezies vorkommt. Zusätzlich kann die originäre begünstigende Mutation innerhalb der Spezies durch horizontalen Transfer in andere Klone verbreitet werden.

Zu beachten bleibt, daß sich bei hohen Gentransferraten adaptierte Mutationen schnell über die Bakterienpopulation einer Nische ausbreiten können, ohne mit einem spezifischen Klon assoziiert zu sein. In diesem Fall unterscheiden sich die Nischensubpopulationen in ihren Genhäufigkeiten jedoch nicht in ihren klonalen Genotypen.

## **Linkage Disequilibrium (Verbindungs-Ungleichgewicht)**

Eine Folge eingeschränkter Rekombination in einer klonal-strukturierten Population ist das Vorhandensein eines "Verbindungs-Ungleichgewichts" (Linkage Disequilibrium) bzw. einer nicht-willkürlichen Verbindung von Allelen in haploiden Genotypen (39). Multilokus-Verbindungen in Populationen bedeuten, daß bestimmte Allelkombinationen auf unterschiedlichen Genen häufiger vorkommen als erwartet, während andere Kombinationen selten sind oder gar fehlen. Ein ausgeprägtes Verbindungs-Ungleichgewicht reflektiert die genotypische Struktur einer Population und hat zur Folge, daß Rekombinationsereignisse eine geringere Auswirkung auf die Zusammensetzung der Gene haben. Bei Ausbleiben von natürlicher Selektion, bei der bestimmte spezifische Genkombinationen favorisiert werden, führt jedoch häufige Rekombination dazu, daß Allelkombinationen in Genotypen zufällig werden, so daß die Genotypstruktur der Population ein Verbindungs-Gleichgewicht erreicht.

### **2.3. Genetische Variation und Rekombination**

Eine Hauptfrage des Studiums der Evolutionsgenetik von *E.coli* lautet:

#### **Welche Rolle spielt die Rekombination bei der Untersuchung der genotypischen Unterschiede unter natürlichen Bedingungen?**

Reproduktion und chromosomaler Genaustausch stellen bei bakteriellen Spezies im Gegensatz zu eukaryotischen Organismen voneinander unabhängige Funktionen dar. Da die bakterielle Reproduktion ein asexueller Vorgang ist, basiert der Austausch von Genen nicht auf wechselseitiger Rekombination.

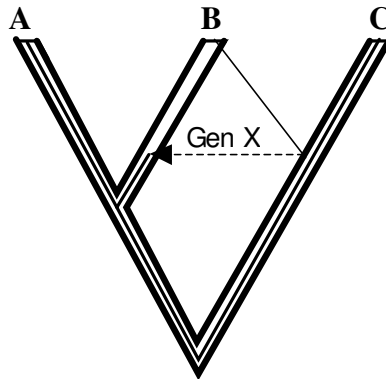
Die Rekombination, also der Transfer genetischen Materials von einem Stamm auf einen anderen, wird als ein Prozeß in der Populationsgenetik angesehen, der das Verbindungs-Ungleichgewicht unterbricht (30). Das Ausmaß des genetischen Transfers variiert von Spezies zu Spezies. So sind Rekombinationsereignisse bei *Helicobacter pylori* so häufig (99), daß keine statistische Assoziation zwischen Allelen unterschiedlicher Loci besteht, d.h. unterschiedliche Loci und Polymorphismen innerhalb der Loci befinden sich im "Verbindungs-Gleichgewicht" (Linkage Equilibrium) (62). Dieses Phänomen wird auch als **Panmixie** bezeichnet.

Die Größe des ausgetauschten DNS-Fragments hängt davon ab, welcher der drei bekannten Mechanismen involviert ist: Transduktions-vermittelte Rekombination transferiert DNS-Stücke in einer Größenordnung von 10-100 kb, während bei der Konjugation Regionen von mehreren hundert bis mehreren tausend Kilobasen übertragen werden können. Der Vorgang der Transformation ist dagegen nicht relevant für *E.coli* (30).

Bei Fehlen der chromosomalen Rekombination sind alle Individuen einer Spezies durch klonale Abstammung verwandt, auch wenn sie sich phänotypisch durch akkumulierte Mutation unterscheiden. Bei einer klonalen Spezies ist die Entstehung unterschiedlicher Gene derselben Stämme gleich, d.h. Gene eines Stammes würden mit Genen eines anderen Stammes denselben jüngsten gemeinsamen Vorfahren teilen.

Wird jedoch die Möglichkeit der Rekombination berücksichtigt, so ist die Entstehung unterschiedlicher Gene derselben Stämme unterschiedlich, d.h. auch die gemeinsamen Vorfahren unterschiedlicher Gene desselben Stammpärchens sind unterschiedlich.

Dykhuizen erläutert diesen Ansatz mit folgendem Modell (30):



**Abb. 1: Auswirkungen der Rekombination auf die phylogenetische Beziehung dreier Stämme**

Ausgangspunkt seiner Betrachtung ist eine Zelle, die sich in zwei weitere Zellen teilt, von der jede wiederum den Vorfahren einer Zelllinie darstellt. Die eine Linie bringt die Stämme A und B hervor, während die andere zu Stamm C führt. Zusätzlich wird ein Gen X von einem Vorläufer des Stammes C auf einen Vorläufer des Stammes B übertragen.

Um die Verwandtschaften zwischen den drei Stämmen A, B und C zu untersuchen, wird die Primärstruktur des entsprechenden Gens eines jeden Stammes analysiert.

Die Untersuchung der meisten sequenzanalysierten Gene dieser Stämme würde zeigen, daß die Stämme A und B einander ähnlicher sind als jeder für sich im Vergleich mit Stamm C. Wird jedoch Gen X sequenziert, so ergibt sich, daß Stamm B näher mit Stamm C verwandt ist als mit Stamm A.

Dieses unterschiedliche Ergebnis resultiert aus der Tatsache, daß die Vorgänge der Rekombination die phylogenetischen Verwandtschaften der Stämme vermischt. Wenn man zeigen kann, daß unterschiedliche Gene derselben Stämme statistisch unterschiedliche Entstehungsgeschichten aufweisen - sowohl in ihrer Anordnung im Stammbaum (wie im oberen Beispiel) als auch bezüglich des Zeitpunktes ihres letzten gemeinsamen Vorfahrens (beurteilt anhand der relativen Rate des akkumulierten Basenpaaraustausches) - dann zeigt das Ergebnis, daß die Rekombination ein wichtiger Parameter in der Entstehung der beobachteten Verteilung von Genotypen in den Spezies ist.

Rekombinationsereignisse werden in drei Klassen eingeteilt (111). Diese Einteilung richtet sich jedoch nicht nach dem Mechanismus des Gentransfers (Konjugation oder Transduktion) sondern nach dem Ergebnis von Rekombinationsereignissen aus populationsgenetischer Sicht. Ereignisse in jeder dieser Klassen schließen den Transfer von genetischem Material zwischen den Bakterienzellen ein und resultieren in der Entstehung rekombinanter Genotypen.

**1. Assortative Rekombination:**

Bereits existierende Allele werden zu neuen Kombinationen gemischt, wodurch neue chromosomale Genotypen entstehen.

**2. Intragenische Rekombination:**

Sie beinhaltet den Austausch von Genstücken (kleiner als Cistrons), was zu neuen Mosaik-Allelen und damit zu neuen Genotypen führt.

**3. Additive Rekombination:**

Sie tritt auf, wenn genetische Elemente integriert werden, um einen zusammengesetzten Genotyp zu formen, der die Summe der rekombinierten Moleküle darstellt (z.B. Aufnahme von Genen anderer Bakterienspezies).

## **Assortative Rekombination**

Um das Ausmaß zu beurteilen, in dem Allele in natürlichen Bakterienpopulationen neu gemischt werden mit der Folge, daß rekombinante chromosomale Genotypen erschaffen werden, hat sich die Methode der Multilokus-Enzymelektrophorese (**MLEE**) bewährt (112).

Diese Technik deckt Proteinpolymorphismen auf, indem sie Isoenzyme aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsrate unter nicht-denaturierenden Bedingungen separiert. Grundlage dieser Methode ist die Tatsache, daß Mobilitätsvarianten (sog. Elektromorphe) eines Enzyms direkt mit den Allelen auf einem einzelnen genetischen Locus korrespondieren. Das ist dadurch bedingt, daß Unterschiede in der Wanderungsrate von Proteinvarianten während der Elektrophorese ein direktes Resultat des Austauschs von Aminosäuren sind, was die elektrostatische Ladung beeinflusst. Durch Vergleich der Elektromorphe eines Enzyms mit Allelen auf dem korrespondierenden strukturellen Genlocus kann jeder bakterielle Stamm durch seinen Multilokus-Genotyp charakterisiert werden. Dabei wird jede unterschiedliche Allelkombination als ein Elektrophoretischer Typ (ET) bezeichnet. Isolate mit identischen elektromorphen Profilen werden als gemeinsame lineare Abkömmlinge einer einzelnen Vorläuferzelle betrachtet und als Mitglieder eines einzelnen Klonen angesehen (109).

Die Elektrophorese von Proteinvarianten mit bekannten Aminosäuresequenzen hat bewiesen, daß diese Methode einen beträchtlichen Prozentsatz aller Nukleotid-austausche aufzeigen kann, die in einem Ersatz von Aminosäuren resultieren. Jedoch kann es vorkommen, daß aufgrund von stillen Nukleotidsubstitutionen und Aminosäureersatz, der nicht die Mobilität unter Standardbedingungen verändert, die elektrophoretisch aufgedeckte allelische Variation und die totale genetische Variation auf einem Locus nicht übereinstimmen (109).

Dennoch kann man durch das screening von Allelvarianten auf vielen Genloci auf die Multilokus-Genotypen der Stämme schließen und aus einer heterogenen Kollektion von Bakterienisolaten genetisch homogene Gruppen herauslösen, natürlich vorkommende Klone innerhalb der Bakterienpopulation darstellen und Gruppen von Klonen identifizieren, die einen jüngsten gemeinsamen evolutionären Ursprung haben.

Angewendet auf *E.coli*-Populationen erbrachte das Studium von Proteinpolymorphismen den Beweis für eine klonale Struktur. Die klonale Hypothese stammte von früheren Beobachtungen identischer Phänotypen - bezüglich so variabler Eigenschaften wie Serovar und Biotyp - zwischen *E.coli*-Stämmen, die aus verschiedenen Krankheitsausbrüchen isoliert wurden (79). Selander und Levin (91) dehnten das Klonkonzept auf die gesamte *E.coli*-Spezies aus, basierend auf dem wiederholten Isolieren von Stämmen mit identischen Multilokus-Enzym-Genotypen.

Ein weiterer Beweis für die klonale Populationsstruktur bei *E.coli* war das Auftreten eines umfangreichen Verbindungs-Ungleichgewichtes bei vielen Enzymloci (107, 108). Die Häufigkeiten von Multilokus-Genotypen in natürlich vorkommenden Populationen weichen signifikant ab von denen, die man bei einem Modell von zufälliger Assoziation erwartet (108).

Bei einer klonalen Populationsstruktur, in der assortative Rekombinationen selten sind, sollte eine Analyse sämtlicher genetischer Charakteristika, die für das Genom repräsentativ sind, die gleichen genetischen Verwandtschaften zwischen den Isolaten hervorbringen. Zahlreiche Studien bewiesen Übereinstimmungen zwischen phylogenetischen Verwandtschaften, beruhend auf Proteinpolymorphismen, und anderen Eigenschaften (2, 76, 78). Gleichzeitig wurden nicht übereinstimmende Phylogenese, die auf Vergleichen unterschiedlicher Gene oder unterschiedlicher Charaktereigenschaften beruhen, als ein Beweis für entwicklungs geschichtlich frühere Rekombinationsereignisse angeführt (10, 27, 30, 92).

## **Intragenische Rekombination**

Das Ausmaß des Verbindungs-Ungleichgewichtes, abgeschätzt anhand von MLEE-Daten, eröffnet Informationen über einen Rekombinationstyp bei Bakterien, nämlich die assortative Rekombination, bei der ganze Allele transferiert werden und zur Entstehung neuer Multilokus-Genotypen führt.

Die intragenische Rekombination dagegen produziert neue Mosaik-Allele, die nicht ohne Kenntnis der Nukleotidsequenz unterschieden werden können von neuen Allelen, die durch Punktmutationen entstehen. Die Methode der MLEE basiert auf dem Austausch von Aminosäuren, der wiederum zu Veränderungen der elektrostatischen Ladung führt, gibt jedoch keinerlei Information über den Grad der Sequenzunterschiede auf synonymen Loci.

Dagegen können sog. stille Substitutionen, die nicht zu einer Veränderung des kodierten Enzyms führen, durch direkte Nukleotid-Sequenzanalyse interner Fragmente von "housekeeping"-Genen erfaßt werden. Diese als Multilokus-Sequenztyping (**MLST**) bezeichnete Methode deckt mehr Variation, also mehr Allele pro Locus auf, als es die MLEE vermag (61). Darüberhinaus können die so erhaltenen Daten weltweit in Datenbanken gespeichert werden und ermöglichen so einen reproduzierbaren Vergleich wissenschaftlicher Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien.

## **Additive Rekombination**

Additive Rekombination kann aus einer Vielzahl von Gentransferereignissen entstehen, z.B. durch die Integration von Bakteriophagen und Plasmiden sowie die Translokation von Insertionssequenzen und austauschbaren Elementen.

Es gibt viele Beispiele des Genaustausches zwischen verschiedenen Prokaryontenspezies, wobei auch einige sehr entfernt verwandte Organismen involviert sind (63).



Von den natürlich vorkommenden *E.coli*-Populationen sind die darmpathogenen *E.coli* am besten charakterisiert, da ihre Bedeutung als Krankheitserreger bei Mensch und Tier eine intensive Auseinandersetzung mit diesen Keimen erforderlich machte.

#### **2.4. Darmpathogene *Escherichia coli* (*E.coli*)**

Darmpathogene *E.coli*-Keime werden aufgrund ihrer in den letzten Jahren aufgedeckten Virulenzfaktoren in derzeit sieben Klassen unterteilt (54). Dabei werden die klinische Symptomatik sowie die von den Stämmen gebildeten Adhäsionsfaktoren und Toxine als Einteilungskriterien verwendet. Einen Überblick über die verschiedenen Klassen vermittelt **Tab. 1**.

#### **Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC)**

Enteropathogene *E.coli* werden durch die Fähigkeit gekennzeichnet, in der Darmschleimhaut charakteristische Läsionen, sog. "attaching-and-effacing"(AE)-Läsionen, hervorzurufen (15, 26, 53). Diese typischen morphologischen Veränderungen gehen mit einem Verlust der Mikrovilli sowie einer massiven Anreicherung von Zytoskelett-Proteinen unterhalb der bakteriellen Anheftungsstelle einher (72).

Der Pathogenese von EPEC-Infektionen liegt ein Drei-Stufen-Modell zugrunde (72): Im ersten Schritt kommt es zu einer initialen Adhäsion der Bakterien an die Darmepithelzellen, die durch wahrscheinlich spezifische, als Bundle-forming Pili (BFP) bezeichnete Fimbrien vermittelt wird. Die Fähigkeit zur Anheftung wird durch das Strukturgen *bfpA* ermöglicht, das von einem 60-MDa großen Plasmid kodiert wird (25, 37).

**Tab. 1: Klassifizierung darmpathogener *Escherichia coli*-Stämme**

Klasse	Virulenzfaktor		Erkrankungen bei	
	Adhäsionsfaktor	Toxin	Mensch	Tier
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	BFP, Intimin	nicht bekannt	Säuglings- durchfall	Jungtier- durchfall
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	F2, F3, CFA/III, CFA/IV  F4, F5, F6, (F17), F41, F18ac	ST u./o. LT	Cholera- ähnliche Erkrankung, Reisediarrhoe	Neugeborenen-u. Jungtierdiarrhoe
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Invasin	Enterotoxin	wässrige Diarrhoe	nicht bekannt
Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC)	Intimin	Stx1 u./o. 2 Hly <sub>EHEC</sub>	HC, HUS	blutiger Durchfall, Ödemkrankheit
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	AAF/I, AAF/II	EAST1	chronischer Durchfall	nicht bekannt
Diffus Adhärente <i>E. coli</i> (DAEC)	F1845 AIDA-I	nicht bekannt	Durchfall	nicht bekannt
Nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC)	F17-ähnlich	CNF-1, CNF-2, Hly <sub>UTI</sub>	nicht bekannt	fraglich

AAF: Aggregative adherence fimbriaeAIDA: Antigen involved in diffuse adhesionBFP: Bundle-forming PiliCFA: Colonization factor antigenCNF: Zytonekrose-FaktorEAST: Hitze-stabiles Enterotoxin der EAggECF: FimbrienantigenHC: Hämorrhagische KolitisHly<sub>EHEC</sub>: EHEC-HämolysinHUS: Hämolytisch-Urämisches-SyndromLT: Hitze-labiles EnterotoxinStx: ShigatoxinST: Hitze-stabiles EnterotoxinUTI: Urinary Tract Infection

In einem zweiten Schritt wird das direkte Haften der Bakterien an den Enterozyten ("attaching") von dem Adhäsionsfaktor Intimin ermöglicht. Dieses äußere Membran-Protein (OMP) mit einem Molekulargewicht von 94 kDa wird vom *eae*-Gen (für *E.coli* attaching-and-effacing) kodiert, welches auf einer Pathogenitätsinsel lokalisiert ist, dem LEE (locus of enterocyte effacement) (47, 48). Der LEE ist darüber hinaus für die Expression verschiedener sezernierter Proteine verantwortlich, die als Folge ihrer Wechselwirkung mit eukaryotischen Rezeptoren zur Auslösung von Signaltransduktionsketten und damit zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts mit dem Verlust von Mikrovilli ("effacing") führen (52).

EPEC-Infektionen sind die häufigste Ursache infektiöser Darmerkrankungen bei Kindern in Entwicklungsländern (19) und gehen mit wässrigen Durchfällen, Erbrechen und Fieber einher (54). EPEC sind auch für Tiere pathogen und verursachen beim Kaninchen große Verluste in der Jungtieraufzucht (14, 67). Gelegentlich wurden EPEC auch bei Durchfallerkrankungen von Kälbern, Ferkeln, Lämmern, Hühnern, Hunden und Katzen isoliert (14, 33, 46, 67, 86, 100).

### **Enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC)**

Enterotoxische *E.coli* zeichnen sich durch die Bildung von plasmidkodierten Hitze-labilen (LT) (42, 82, 94) und/oder Hitze-stabilen (ST) (35, 69, 70) Enterotoxinen aus. Beide Toxingruppen werden in jeweils zwei weitere Untergruppen (LT-I und LT-II bzw. ST-I und ST-II) unterteilt, die immunologisch nicht miteinander kreuzreagieren (72).

Das Hitze-labile Enterotoxin LT-I ähnelt in seiner Struktur und Funktionsweise dem bei *Vibrio cholerae* vorkommenden Cholera-toxin (CT) (72). LT-I ist ein oligomeres Toxin und besteht aus einer 28 kDa großen A-Untereinheit, die für die enzymatische Aktivität des Toxins verantwortlich ist, und fünf jeweils 11,5 kDa großen B-Untereinheiten, die für die Bindung an die Zellmembranen zuständig sind (72).

Nach erfolgter Endozytose steigert das Toxin durch eine ADP-Ribosylierung den cAMP-Gehalt der Enterozyten, was zur Stimulation von Proteinkinasen und damit zu einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Spiegels führt. LT-I löst eine verstärkte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion der Krypten-Epithelzellen mit gleichzeitig einhergehender verringerter  $\text{NaCl}$ -Absorption aus. Die Folge ist eine osmotische Diarrhoe (72).

LT-II sind in ihrer A-Untereinheit zu 55 bis 57 % identisch mit LT-I und CT, zeigen jedoch bezüglich der B-Untereinheit keine Übereinstimmung mit LT-I und CT (72). Der Wirkungsmechanismus dieses Toxins, das in zwei antigenen Varianten LT-IIa und LT-IIb vorkommt, entspricht dem des LT-I, jedoch ist seine enzymatische Aktivität in vitro 25-50mal schwächer (42).

Während LT-I von *E.coli*-Stämmen exprimiert wird, die sowohl für Menschen als auch für Tiere pathogen sind, findet man LT-II hauptsächlich bei animalen *E.coli* Isolaten und nur selten bei humanen, wobei sie bei beiden nicht mit Krankheiten assoziiert sind (72).

Im Gegensatz zu den großen oligomeren LTen stellen sich die Hitze-stabilen Enterotoxine (ST) als kleine monomere Toxine dar, deren zahlreiche Cysteinreste über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und damit die Hitzestabilität dieser Toxine sicherstellen (72). Die zwei voneinander unabhängigen Toxinklassen (ST-I und ST-II) unterscheiden sich in Struktur und Wirkungsmechanismus. Gene für beide Klassen finden sich vornehmlich auf Plasmiden, seltener auf Transposons (72).

Das Hapten ST-I mit einem Molekulargewicht von nur 2.000 Da bindet an ein ca. 140 kDa-großes G-Protein, dessen intrazelluläre Domäne an eine Guanylat-Zyklase gekoppelt ist (23). Die Bindung der Guanylat-Zyklase bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels sowie des  $\text{Ca}^{++}$ -Gehaltes und hat damit Imbalancen im  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Haushalt zur Folge. Das äußert sich wie beim LT ebenfalls in einer osmotischen Diarrhoe (34).

ST-I kommt in zwei Subtypen vor, ST-Ia und ST-Ib. Neben den ETEC verfügen zahlreiche andere gram-negative Keime wie *Yersinia enterocolitica* und *Vibrio cholerae* non-O1 über ST-I (72).

ST-II spielt vor allem beim Schwein als Durchfallerreger eine Rolle (68). Im Gegensatz zu ST-I induziert ST-II histologische Läsionen am intestinalen Epithel, die zum Verlust der Mikrovilli und zu partieller Villusatrophie führen (72). Darüberhinaus stimuliert ST-II die Sekretion von Bikarbonat. Obwohl ST-II die intrazellulären cAMP- bzw. cGMP-Spiegel nicht erhöht, bewirkt es einen intrazellulären Anstieg der  $Ca^{++}$ -Konzentration aus extrazellulären Quellen (72).

Voraussetzung für die Anheftung der ETEC an Enterozyten ist das Vorhandensein von spezies-spezifischen Fimbrien. Die wichtigsten Fimbrien sind in **Tab. 1** aufgelistet.

ETEC-bedingte Infektionen sind eine weit verbreitete Ursache von Darmerkrankungen bei Kleinkindern und Reisenden in Entwicklungsländern. Sie äußern sich in wässrigen Durchfällen, abdominalen Krämpfen, Fieber und Erbrechen (54). Beim Tier sind vor allem neugeborene Lämmer, Kälber und Ferkel betroffen. ETEC kommen aber auch bei Hund und Katze vor (11, 51, 95, 102).

### **Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)**

Enteroinvasive *E.coli* sind mit Ausnahme der fehlenden Shigatoxinbildung bezüglich ihrer pathogenen Eigenschaften den Shigellen sehr ähnlich (29) und verursachen beim Menschen meist wässrige Diarrhoe. Für Durchfallerkrankungen vom Tier scheinen sie keine Relevanz zu haben.

Gene, die für die Invasivität der EIEC verantwortlich sind, sind auf einem 140 MDa großen Plasmid lokalisiert. Unter den sezernierten Proteinen spielt das Invasin als Anheftungsstruktur die Hauptrolle (72). Der Nachweis eines 63 kDa großen sog. Shigella Enterotoxin-Gens (*sen*) könnte eine Erklärung dafür sein, daß EIEC-Infektionen beim Menschen lediglich zu wässrigen Durchfällen führen (72).

## **Shigatoxin-bildende *E.coli* (STEC)**

Shigatoxin-bildende *E.coli* (STEC) produzieren ein oder mehrere Shigatoxine. Sie konnten zunächst beim Menschen, später jedoch auch beim Nutztier isoliert werden (28, 44, 46, 59, 71, 81, 103) und sind die einzigen Vertreter darmpathogener *E.coli*-Stämme, für die ein Zoonosecharakter nachgewiesen wurde. Hauptreservoir ist das Rind, wobei die STEC-Ausscheidung meist nur beim Jungtier mit teilweise blutigem Durchfall einhergeht (71).

Da STEC neben wässrigem Durchfall beim Menschen auch eine hämorrhagische Kolitis (HC) und/oder das Hämolytisch-Urämische-Syndrom (HUS) auslösen können (50, 54), werden sie auch als Enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC) bezeichnet (54, 55). Diese lassen sich nach dem Vorkommen ihrer Virulenzmerkmale in zwei weitere Gruppen unterteilen:

### **Typische EHEC:**

Die typischen EHEC verfügen neben dem Shigatoxin über den LEE und ein auf einem 60 MDa großen Plasmid kodiertes EHEC-Hämolysin (Hly<sub>EHEC</sub>). Zu diesen zählen vor allem EHEC der Serovare O157:H7, O111:H-, O103:H2 und O26:H11 (72).

### **Untypische EHEC:**

Zu den untypischen EHEC zählen die Serovare, deren einziger bekannter virulenzassoziierter Faktor das Shigatoxin darstellt (72).

Das Hauptmerkmal der STEC, die Shigatoxinbildung, ist auf lysogenen lambdoiden Bakteriophagen kodiert (74, 75). Shigatoxine bestehen aus einer 32 kDa großen A-Untereinheit, verantwortlich für die enzymatische Aktivität, und fünf identischen, 7,7 kDa großen B-Untereinheiten, über die die Bindung des Toxins an einen spezifischen Glykolipidrezeptor (Globotriaosylceramid, Gb3) auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen vermittelt wird.

Nach erfolgter Endozytose und Bindung an die 60S-Ribosomen hemmt die A-Untereinheit über eine N-Glykosidaseaktivität die Proteinbiosynthese, was den Untergang renaler Endothelzellen und intestinaler Epithelzellen zur Folge hat (72).

Die Shigatoxin-Familie besteht aus den beiden immunologisch nicht kreuzreagierenden Gruppen Stx1 und Stx2. Während Stx1 hochkonserviert ist, existieren innerhalb der Stx2-Gruppe Sequenzvarianten (72). Das Stx2e stellt darunter eine Besonderheit dar: Diese Shigatoxinvariante bindet im Gegensatz zu den anderen Shigatoxinen bevorzugt an einen Globotetraosylrezeptor (Gb4) und verursacht beim Schwein die Ödemkrankheit der Absatzferkel. Die hierfür verantwortlichen STEC gehören den Serovaren O138:K81, O139:K82 und O141:K85 an (44).

### **Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC)**

Im Gegensatz zu den EPEC bilden Enteroaggregative *E.coli* keine charakteristischen Mikrokolonien auf der Enterozytenoberfläche sondern lagern sich in typischer Weise zu Aggregaten zusammen (72). EAggEC-Infektionen wurden vor allem bei Kindern nachgewiesen und äußern sich in wässrigen, mukoiden, oft persistierenden Durchfällen (72). Aus Infektionsversuchen beim Ferkel ist bekannt, daß EAggEC auch für diese Tierart pathogen sind (104), scheinen aber darüberhinaus epidemiologisch beim Schwein keine Bedeutung zu haben.

Verantwortlich für die Aggregation sind zwei flexible, aggregative Adhärenzfimbrien (AAF/I und AAF/II), die die initiale Kolonisation ermöglichen (72). Es folgt eine verstärkte Mukusproduktion der Epithelzellen, die zu persistierender Kolonisation und Malabsorption führt. Zusätzlich werden Cytotoxine freigesetzt. Das EAST1 ist ein dem Hitze-stabilen *E.coli*-Enterotoxin verwandtes Toxin, dessen Wirkungsweise noch nicht vollständig geklärt ist. Das EAggEC-Hämolyysin hat einen Anstieg des intrazellulären  $Ca^{++}$ -Gehaltes zur Folge und wird erst nach Anheftung der EAggEC an Zielzellen freigesetzt (4).

### **Diffus Adhärente *E.coli* (DAEC)**

Diffus adhärenente *E.coli* wurden nach Entdeckung der EAggEC als eine eigenständige Kategorie der darmpathogenen *E.coli* anerkannt. Die Nomenklatur richtete sich nach ihrem diffusen Adhäsionsmuster in Adhäsionsversuchen. DAEC-Infektionen wurden vor allem bei Kindern mit wässrigen Durchfällen nachgewiesen (72).

DAEC produzieren keine Toxine, jedoch zwei unterschiedliche Adhäsionsfaktoren. Das Fimbrienantigen F1845 ist sowohl chromosomal- als auch plasmidkodiert und besteht aus einem 95 kDa großen Protein (8). Das plasmidkodierte Protein AIDA-I (für adhesin involved in diffuse adherence) spielt als Adhäsionsvermittler an HeLa-Zellen eine Rolle und weist eine Größe von 100 kDa auf (6).

### **Nekrotoxische *E.coli* (NTEC)**

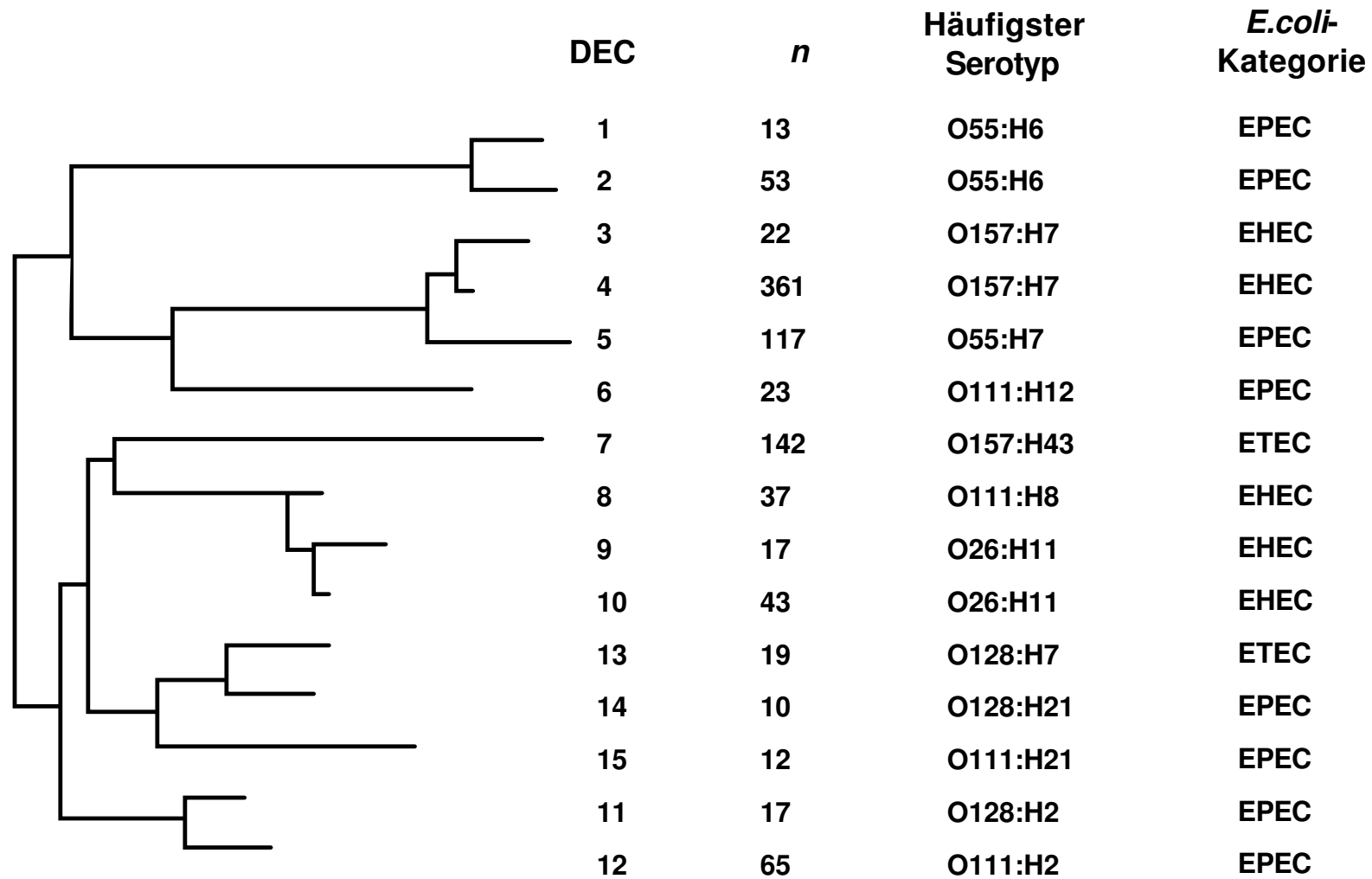
Neben den sechs international anerkannten Klassen darmpathogener *E.coli* gibt es weitere Stämme, die sich durch die Bildung eines Zytonekrose-Faktors (CNF) auszeichnen und daher nicht in die o.g. Klassen eingeteilt werden können. Sie werden als Nekrotoxische *E.coli* bezeichnet und nach dem Vorkommen ihrer Zytonekrose-Faktoren in CNF1- bzw. CNF2-bildende Stämme differenziert (22).

CNF1-bildende NTEC (NTEC-1) sind vor allem beim Menschen mit extraintestinalen Infektionen nachgewiesen worden, während CNF2-bildende NTEC (NTEC-2) beim Kalb sowohl mit Durchfall als auch mit Septikämien in Verbindung gebracht werden konnten (16). Im Gegensatz zu NTEC-2 bilden NTEC-1 meist zusätzlich ein Hly<sub>UTI</sub>. (31).



## 2.5. Definierung klonaler Gruppen

Mit Durchfall assoziierte darmpathogene *E.coli* können bestimmten O:H-Serotypen zugeordnet werden. Diese Beobachtung brachte Whittam et al. (110) dazu, 1300 *E.coli*-Stämme, die weltweit von Patienten mit Durchfall oder anderen intestinalen Krankheiten isoliert worden waren, mit der Multilokus-Enzymelektrophorese (MLEE) auf ihre genetische Variation hin zu untersuchen. Anhand der Analyse der Proteinpolymorphismen innerhalb der 1300 Isolate konnten 23 distinkte Klone unterschieden werden. Von diesen wurden 15 Klone, die unter den untersuchten Stämmen die größte Verbreitung besitzen, zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes herangezogen (**Abb. 2**). Diese Klone bezeichnete Whittam (110) als **Diarrheagenic *E.coli* (DEC)**. Zu den häufigsten DEC-Klonen gehören Stämme der Serogruppen O26, O55, O111, O128 und O157. Untersuchungen der Allelprofile ergaben, daß zwischen DEC-Klonen verschiedener Serotypen und Krankheitsbildern enge genetische Verwandtschaften bestehen (110). So unterschieden sich beispielsweise die Gruppen DEC 3 und DEC 4, die die O157:H7 Klone enthielten, nur in einem Allel vom Multilokus-Genotyp der DEC 5 Gruppe, dem Hauptklon von O55:H7. Klone dieser Gruppen waren nicht nur untereinander eng verwandt, sondern sie unterschieden sich auch deutlich von Klonen anderer Gruppen wie DEC 6, in der vor allem die Serovar O111:H12 eingeordnet wurde. Da die untersuchten Stämme, die einen identischen Enzymtyp aufwiesen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten von Patienten in geographisch getrennten Gebieten isoliert worden waren, stellte Whittam die Vermutung auf, daß diese Multilokus-Genotypen pathogene Klone mit einer großen geographischen Verbreitung darstellen. Im Gegensatz zu panmiktischen Spezies wie z.B. *Helicobacter*, die eine freie genetische Rekombination aufweisen (99), kann man anhand der klonalen Verbreitung von *E.coli*-Keimen die Entwicklungsgeschichte einzelner Klone nachvollziehen. Das Aufdecken klonaler Verwandtschaften zwischen *E.coli*-Stämmen wird jedoch dadurch erschwert, daß innerhalb einer einzigen Generation durch horizontalen Gentransfer neue, bislang in der Population nicht vorhandene genetische Informationen eingeführt werden können.



SKALA  
0.1 1.0  
Genetische Distanz

Abb. 2. Definierung von Diarrheagenic *E.coli* (DEC)-Klonen nach Whittam (110)

So können z.B. pathogene Eigenschaften durch den Erwerb einer Pathogenitätsinsel wie den LEE entscheidend verändert werden. Solche LEE-positiven DEC-Klone wurden aufgrund ihrer zentralen Bedeutung als Krankheitserreger zum Gegenstand weiterer Untersuchungen.

### **LEE-positive DEC-Klone**

Pathogenitätsinseln sind häufig mit tRNS-Genen assoziiert. So ist z.B. die LEE-Insertionsstelle im 1995 von McDaniel (64) veröffentlichten EPEC-Stamm E2348/69 (O127:H6) im tRNS-Lokus *se/C* bei min. 82 des *E.coli*-Chromosoms lokalisiert.

Bei weiteren Analysen der DEC-Klone im Hinblick auf die Insertionsstelle des LEE fiel auf, daß neun DEC einen LEE aufwiesen. Nur bei fünf der neun LEE-positiven DEC-Klone war der LEE jedoch in *se/C* inseriert. Darunter befanden sich die derzeit epidemiologisch wichtigsten Stämme der Serovar O157:H7. Da der *se/C*-Lokus in den anderen untersuchten LEE-positiven DEC-Stämmen jedoch intakt war, lag die Vermutung nahe, der LEE könne im Laufe der Entwicklungsgeschichte dieser klonalen Linien in einem anderen Ort des Chromosoms inseriert sein (116). Benkel et al. (5) konnten nachweisen, daß der LEE des STEC-Stammes 413/89-1 (O26:H-) im tRNS-Lokus *pheU* bei min. 94 des *E.coli*-Chromosoms inseriert ist. In PCR-Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß der LEE bei einigen Stämmen, so z.B. beim O103:H2, weder im *se/C* noch im *pheU* lokalisiert ist, so daß mindestens ein weiterer LEE-Insertionsloкус im Chromosom existieren muß (5, 116). Diese Aussage läßt vermuten, daß ein Rekombinationsereignis stattgefunden haben muß, das dem Modell der additiven Rekombination entspricht.

## Evolution von *E.coli* O157:H7 und anderen STEC

Die klonale Entwicklungsgeschichte LEE-positiver *E.coli*-Stämme wurde am ausführlichsten für die Serovar O157:H7 erforscht. Whittam hat in zahlreichen MLEE Untersuchungen gezeigt, daß der O157:H7 Klon genetisch einem EPEC-Stamm der Serovar O55:H7 näher verwandt ist als anderen O157-Stämmen, die von durchfallkranken Tieren isoliert wurden (113). Dieser O55:H7 Klon ist mit Durchfall bei Kleinkindern assoziiert und produziert kein Shigatoxin (113). Whittams Modell basiert auf der Annahme, daß im Zuge der Entwicklung eines Klones der Funktionsverlust metabolischer Gene wahrscheinlicher ist als der Funktionsgewinn und daß ein Funktionsgewinn normalerweise via lateralem Gentransfer stattfindet. Es folgt damit den Grundzügen des Klonalen-Rahmen-Modells. Die einzelnen Evolutionsschritte des O157:H7 Klones sind in **Abb. 3** aufgezeichnet.

Ausgegangen wird von einem EPEC-ähnlichen Vorläuferstamm, von dem der O55:H7 Klon abstammt und bei dem die Pathogenitätsinsel LEE in *sefC* inseriert ist. Der zweite Schritt ist charakterisiert durch die Transduktion mit einem Toxin-konvertierenden Bakteriophagen und resultiert in der Entwicklung eines Shigatoxin-2-produzierenden O55:H7-Stammes. Durch Genaustausch von O55 zu O157 entsteht ein hypothetischer *stx2*-produzierender O157:H7 Vorläufer, der zusätzlich vermutlich ein EHEC-Plasmid trägt (101). Bilge et al. (9) vermuten, daß der Übergang vom O55-zum O157-Antigen Ergebnis von lateralem Transfer und Rekombination einer *rfa*-Region ist, die für ein *rfaE*-Gen kodiert, das einer Perosamin-Synthetase von *Vibrio cholerae* homolog ist. Aus diesem O157:H7 Vorläufer entstanden zum einen durch Mobilitätsverlust der O157:NM Klon und zum anderen vermutlich durch Phagen-Konversion der nun *stx1*-und *stx2*-produzierende O157:H7 Klon. Dieser streute dann weltweit (113).

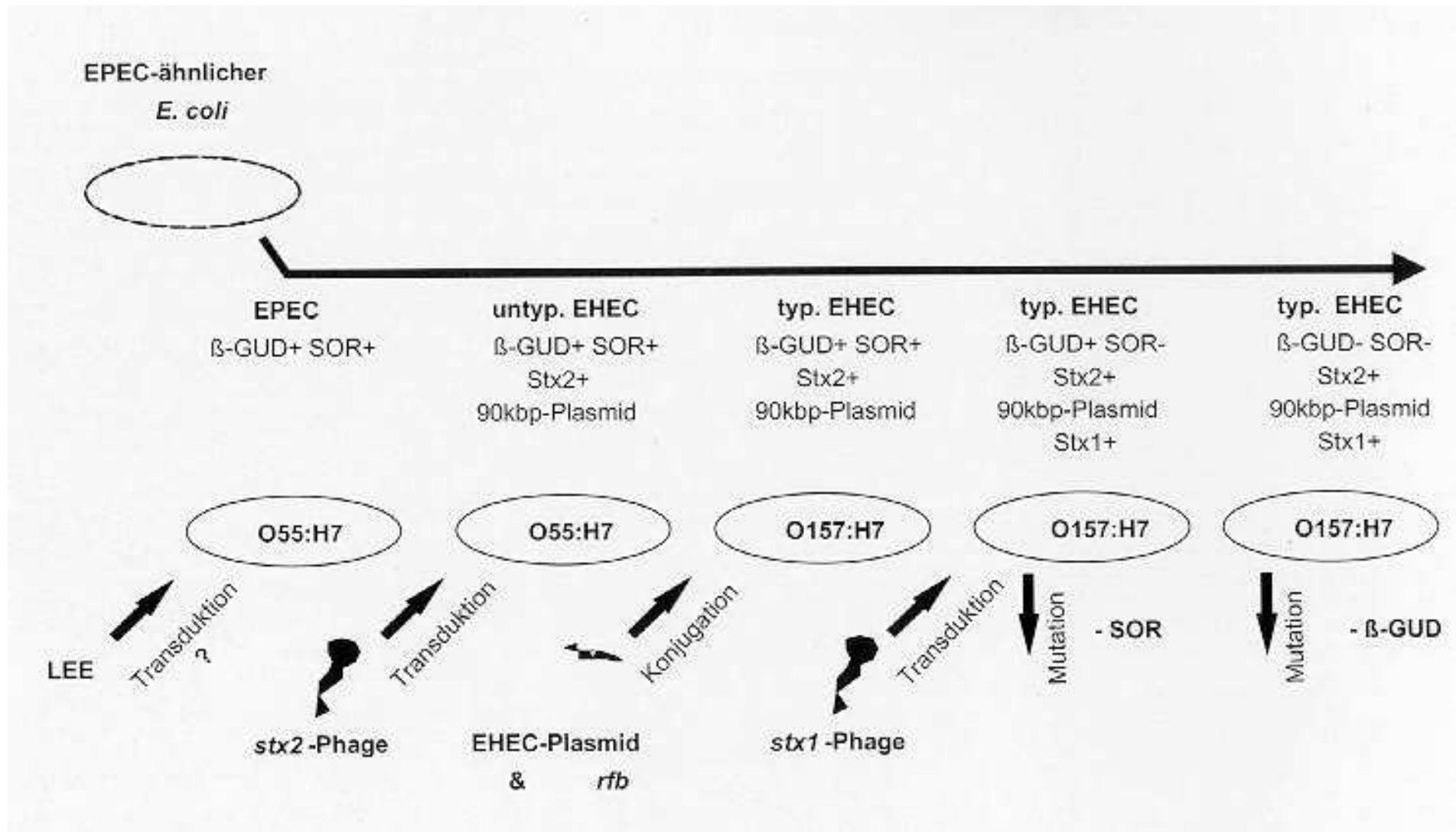


Abb. 3. Stufenweise Entstehung von EHEC O157:H7 (modifiziert nach Whittam, 1998) (113)

Innerhalb der STEC nehmen die Klone der Serogruppen O55 und O157 eine besondere Stellung ein. Die Heterogenität der *E.coli*-Stämme, die Shigatoxin-Gene tragen, ist enorm. Klonale Analysen von Whittam et al. (113) zeigten, daß sich die untersuchten *stx*-positiven Stämme in vier große Gruppen unterteilen ließen (**Abb. 4**):

Der Klonkomplex **EHEC 1** umfaßt die meisten mit humanen Krankheiten assoziierten *stx*<sup>+</sup>-Klone. Darunter befinden sich die *E.coli*-Serovare O157:H7, O157:H- sowie die nicht-zytotoxischen O55:H7 Stämme.

Der Gruppe **EHEC 2** werden die meisten nicht-O157-Stämme, die Shigatoxin produzieren, zugeordnet. Dazu gehören die Serovare O111:H8, O111:H11, O111:H- sowie O26:H11. EHEC-Mitglieder dieser Gruppe sind *eae*<sup>+</sup>, *stx1*<sup>+</sup> und produzieren ein Enterohämolysin. Neben humanpathogenen Stämmen finden sich hier auch tierpathogene Isolate, wie z.B. O111:H-, ein für gnotobiotische Schweine hoch virulenter Stamm, und der für Kaninchen pathogene *E.coli*-Keim RDEC-1 (für Rabbit Diarrheagenic *E.coli*), ein O15:H-.

Die dritte Gruppe wird als **STEC 1** bezeichnet und beinhaltet viele unterschiedliche O-Serogruppen, die häufig mit dem H21 Antigen assoziiert sind. Dazu gehören O113:H21, OX3:H21 und O91:H21. Mitglieder dieser Gruppe exprimieren kein Intimin und verfügen nicht über den LEE. Die große Heterogenität dieser Gruppe hinsichtlich der Serovare deutet darauf hin, daß sich ihre antigenen Eigenschaften sehr schnell durch Mutation oder Rekombination verändert haben. Viele ihrer Stämme produzieren eine *stx2*-Variante.

Zu der vierten Gruppe, **STEC 2**, gehören die Serovare O103:H2, O103:H6 und O45:H2. Über die Virulenz dieser Stämme ist nicht viel bekannt, klonale Analysen zeigten jedoch, daß ihr chromosomaler Hintergrund stark von dem anderer STEC-Gruppen abweicht.

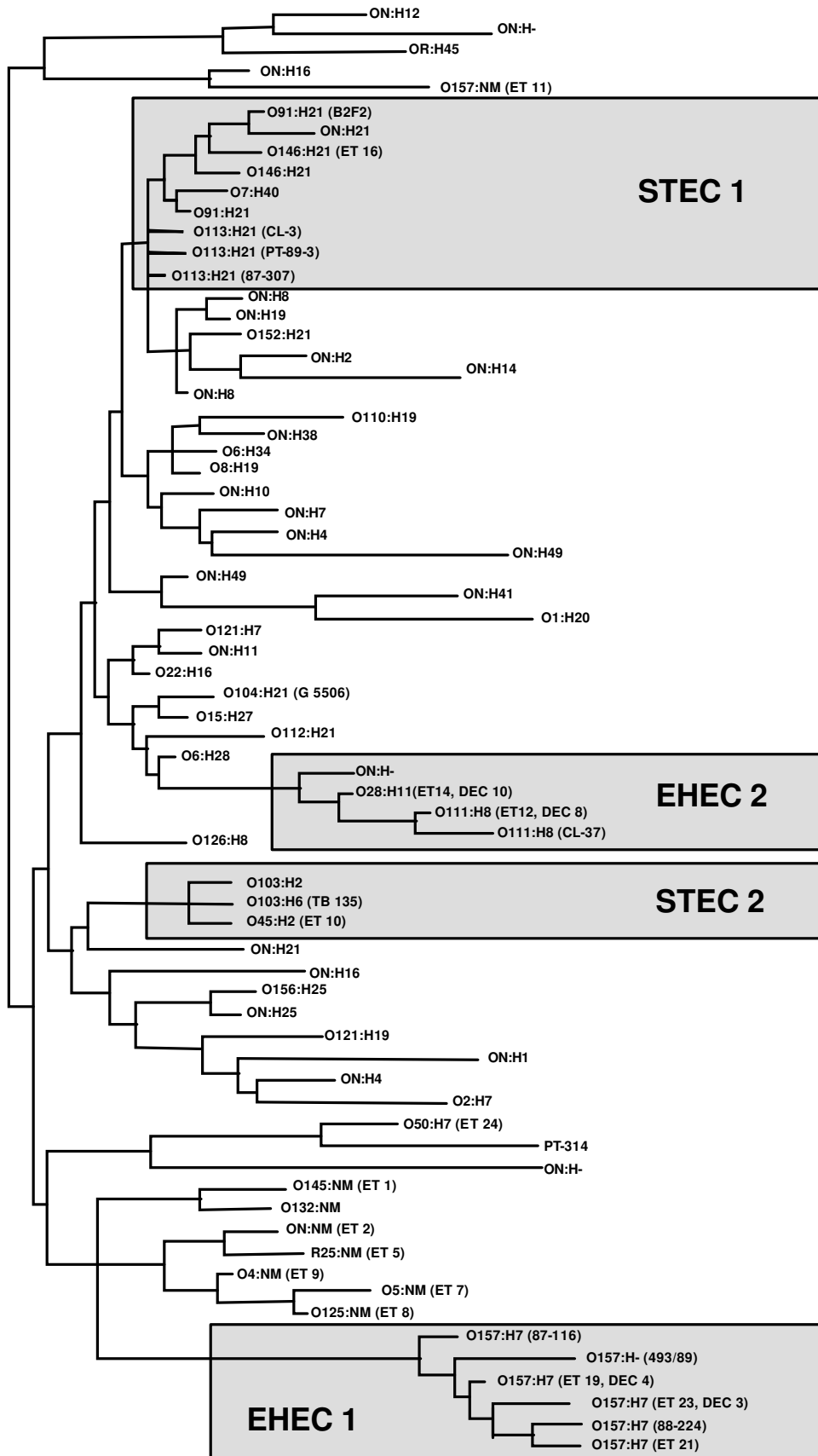


Abb. 4: Klonale Verwandtschaft von STEC beim Menschen (nach Whittam, 1998)

Interessant an diesem Modell ist die Verteilung der verschiedenen H-Antigene, die die Mobilitätsfähigkeit der Bakterien charakterisieren. So können bestimmte H-Antigene (z.B. H21) bestimmten Gruppen (z.B. STEC 1) zugeordnet werden, die wiederum über charakteristische Virulenzfaktoren verfügen. Die Unterteilung der STEC in diese vier Gruppen weist jedoch noch zahlreiche Lücken auf, da Whittams Evolutionsmodell auf Stämmen basiert, die vor allem in den USA isoliert wurden und dort schwere Krankheitsausbrüche hervorgerufen haben. Serovare, die in Westeuropa eine große Rolle spielen, wurden nicht berücksichtigt. Daher sind weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet unerlässlich.

### **STEC der Serogruppe O118**

Die Untersuchungen der Entwicklungsgeschichte verschiedener Bakterienpopulationen haben gezeigt, daß es viele unterschiedliche Evolutionsmodelle gibt. Sie wurden durch die Analyse der pathogenen Keime erstellt, die für bestimmte, meist räumlich begrenzte Krankheitsausbrüche verantwortlich waren. Da sich jedoch die Bakterienpopulationen verschiedener Länder hinsichtlich ihrer Prävalenz und Pathogenität unterscheiden, weisen die aufgeführten Modelle zahlreiche Lücken auf. Stämme, die in Westeuropa weit verbreitet sind, spielen in den USA beispielsweise nur eine untergeordnete Rolle. Durch detaillierte Untersuchungen der Bakterienpopulationen in verschiedenen Regionen können die vorhandenen Lücken geschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit widmeten wir uns den STEC der Serogruppe O118 beim Rind. Die Erreger sind in Deutschland in der Rinderpopulation weit verbreitet, werden jedoch beim adulten Rind nur selten mit Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Unter den kälberpathogenen Stämmen dagegen hat die Serogruppe O118 die höchste Prävalenz (85, 117).

Da STEC als Krankheitserreger für den Menschen eine große Bedeutung haben und ein Kontakt zwischen Mensch und Rind häufig zustande kommt, sollte die Serogruppe O118 hinsichtlich ihres Zoonosepotentials sowie des Vorhandenseins wirtsadaptierter Klone untersucht werden.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Herkunft der Teststämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Feld- und Referenzstämme sind in **Tab. 2a, b** und **c** aufgelistet. Sie wurden entweder in Form von Glycerinkulturen bei -80°C tiefgefroren gelagert oder auf Blut- bzw. Waschblutagarplatten ausgestrichen im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. Die Serotypisierung der Isolate wurde freundlicherweise vom Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführt.

Das Untersuchungsgut umfaßte insgesamt 100 *E.coli*-O118-Isolate, darunter 65 Stämme vom Rind, 29 Stämme vom Menschen, fünf Stämme vom Schwein sowie einen Stamm von einer Ziege. Als Referenzstämme für die Serogruppe wurden zusätzlich vom Menschen ein O157:H7 (EDL 933) sowie ein O26:H11 (H19) und vom Rind ein O26:H- (413/89-1) Stamm in die Untersuchungen miteinbezogen.

Unter den Isolaten boviner Herkunft stammten die meisten von kranken Kälbern aus verschiedenen Ländern der BRD und wurden in den Jahren 1983 bis 1997 isoliert. Insgesamt waren es 53 Kälber, die zum Zeitpunkt der Untersuchung jünger als 12 Wochen waren. Unter den 53 Kälbern befanden sich zehn gesunde und 40 durchfallkranke Tiere, sowie zwei Tiere mit unbekanntem Gesundheitszustand. Der Stamm 31W/Orskov wurde von einem Kalb mit Septikämie in Schweden isoliert und als O118-Referenzstamm in die Untersuchungen miteinbezogen. Zwei Stämme wurden aus Kalbfleisch isoliert, das zumindest in einem Fall von einem durchfallkranken Tier stammte. Vom adulten Rind konnten 10 Stämme isoliert werden, darunter fünf von gesunden und fünf von durchfallkranken Tieren.

Unter den 25 STEC-Isolaten humaner Herkunft wurden vier bei HUS-Patienten (Italien, Kanada, BRD) nachgewiesen, während der Großteil der übrigen Isolate (18) von Durchfallpatienten stammte. Bei drei Patienten wurden eine Gastroenteritis bzw. abdominale Schmerzen und Erbrechen festgestellt. Bei einem Patienten war der Gesundheitszustand unbekannt.

Bei den vier Stämmen aus Peru handelte es sich um Enterotoxische *E.coli* (ETEC), die von durchfallkranken Kindern isoliert wurden und als Vergleich für die Serogruppe mit untersucht wurden.

Die fünf O118-Isolate vom Schwein stammten von 2-8-Wochen alten Tieren aus Kanada, die mit Ausnahme zweier Tiere unterschiedliche Erkrankungen aufwiesen (siehe **Tab. 2a**).

Der einzige hier untersuchte Stamm von einer Ziege wurde bei einem durchfallkranken Tier aus der Schweiz isoliert.

Ich möchte mich im folgenden bei den Kooperationspartnern bedanken, die mir freundlicherweise einen Teil der o.g. Isolate zur Verfügung gestellt haben:

S. Aleksic	Hygiene Institut Hamburg, BRD
F. Allerberger	Institut für Hygiene, Innsbruck, Österreich
L. Beutin	Robert-Koch-Institut, Berlin, BRD
J. Blanco	Laboratorio de Referencia de <i>E.coli</i> (LREC), Lugo, Spanien
M. Bülte	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen, BRD
A. Caprioli	Laboratorio di Medicina Veterinaria, Rom, Italien
L. Corboz	Institut für Veterinär-Bakteriologie, Universität Zürich, Schweiz
J. Fairbrother	Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Kanada
R. Johnson	Health of Animals Laboratory, Guelph, Kanada
H. Karch	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, JMU Würzburg, BRD
D. Pierard	Academisch Ziekenhuis, Vrije Universiteit, Brüssel, Belgien
P. Pohl	Institut National de Recherches Vétérinaires, Brüssel, Belgien
H. Smith	Central Public Health Lab Service, London, UK
H. Steinrück	Robert-Koch-Institut, Berlin, BRD
H. Tschäpe	Referenzzentrum für Enterobacteriaceae, Wernigerode, BRD
A. Weber	LUA für das Gesundheitswesen Nordbayern, Nürnberg, BRD

**Tab. 2a: Herkunft der *E.coli*-O118-Stämme vom Tier**

Serovar	Stamm	Isoliert aus		Klinischer Status
		Altersgruppe	Land	
O118:H16	RW 2303**	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 2126**	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 0203	Kalb	D/NRW	Durchfall
	GS 1181-1	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 2199	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	666/89	Kalb	D/Bayern	Durchfall
	RW 2022	Kalb	D/Rhl.-Pflz	Durchfall
	RW 1306***	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1912	Kalb	D/NRW	Durchfall
	RW 1362	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1303****	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1366	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1319	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1305	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1817	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1307***	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1318	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1299	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 1304****	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 2017	Kalb	D/Rhl.-Pflz	Durchfall
	RW 1365	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 2039	Kuh	D/Hessen	Durchfall
	RW 2173	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 2266	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 2125	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	340	Kalb	Belgien	Durchfall

Fortsetzung Tab. 2a: Herkunft der *E.coli*-O118-Stämme vom Tier

Serovar	Stamm	Isoliert aus		Klinischer Status
		Altersgruppe	Land	
O118:H16	RW 0136	Kalb	Schweiz	Durchfall
	RW 2116	Kuh	D/Hessen	Durchfall
	RW 2136	Kuh	D/Hessen	Durchfall
	RW 2297	Kuh	D/Hessen	Durchfall
	RW 1911	Kalb	D/Rhl.-Pflz	Durchfall
	340 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	341 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	342 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	347 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	363 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	364 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	365 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	366 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	367 S89	Kalb	Belgien	Durchfall
	WK 100-1/88	Kalb	Schweiz	Durchfall
	EC 910155	Kalb	Kanada	Unbekannt
	EC 910224	Kalb	Kanada	Unbekannt
	GS 1236-1*	Kalb	D/Hessen	o.b.B.
	GS 1232-1	Kalb	D/Hessen	o.b.B.
	GS 1161-1*	Kalb	D/Hessen	o.b.B.
	GS 1180-1	Kalb	D/Hessen	o.b.B.
	GS 1205-1	Kalb	D/Hessen	o.b.B.
D 1154/10	Kalb	D/Bayern	o.b.B.	
VTB 110	Kuh	Spanien	o.b.B.	
VTB 113	Kalb	Spanien	o.b.B.	

Fortsetzung Tab. 2a: Herkunft der *E.coli*-O118-Stämme vom Tier

Serovar	Stamm	Isoliert aus		Klinischer Status
		Altersgruppe	Land	
O118:H16	EC 920379	Kalb	Kanada	o.b.B.
	EC 920433	Kalb	Kanada	o.b.B.
	EC910017	Kalbfleisch	Kanada	Durchfall
	VTF 205	Kalbfleisch	Spanien	Unbekannt
O118:NM	557/89	Kalb	D/Bayern	Durchfall
	RW 2311	Kuh	D/Hessen	Durchfall
	RW 1302	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	RW 2030	Kalb	D/Hessen	Durchfall
	31W/Orskov	Kalb	Dänemark	Septikämie
	173a103531-1	Kuh	D/Bayern	o.b.B.
	173a103531-7	Kuh	D/Bayern	o.b.B.
	173a433917-1	Kuh	D/Bayern	o.b.B.
	173a433917-2	Kuh	D/Bayern	o.b.B.
	EC 920287	Kalb	Kanada	o.b.B.
	Zg 56-1/90	Ziege	Schweiz	Durchfall
	P 86-82C	Schwein	Kanada	Durchfall
	O118:H9	P 85-285	Schwein	Kanada
P 85-347A		Schwein	Kanada	Unbekannt
P85-1219A1		Schwein	Kanada	Unbekannt
P85-2112		Schwein	Kanada	Polyarthritits

**Tab. 2b: Herkunft der *E.coli*-O118-Stämme vom Menschen**

Serovar	Stamm	Isoliert aus		Klinischer Status
		Altersgruppe	Land	
O118:H16	CB 5482*****	Erwachsener	D/NRW	Durchfall, HIV, HUS
	CB 5483*****	Erwachsener	D/NRW	Durchfall, HIV, HUS
	CB 6175	Kind	D/Bayern	Durchfall
	CB 6236	Erwachsener	Unbekannt	Durchfall
	CB 6365*****	Erwachsener	D/NSA	Durchfall
	CB 6366*****	Erwachsener	D/NSA	Durchfall
	EH 78	Kind	Belgien	Durchfall
	E-D 143	Kind	Italien	HUS
	T 17968	Erwachsener	Österreich	Durchfall
	VTH 28	Kind	Spanien	Erbr., abd. Schmerz
	VTH 62	Erwachsener	Spanien	Durchfall, Erbrechen
	EC 970130	Kind	Schweiz	Durchfall
	98-08665	Erwachsener	D/Bayern	Durchfall
	98-10617-1	Erwachsener	D/Schlesw.-H.	Gastroenteritis
	98-12039	Erwachsener	D/NSA	Unbekannt
	O118:H12	CB 6069	Erwachsener	D/NRW
EH 101		Erwachsener	Belgien	Durchfall
E 25702/0		Erwachsener	UK	Durchfall
E 29558/0		Erwachsener	UK	blutiger Durchfall
E 40829/0		Kind	UK	blutiger Durchfall
E 40841/0		Erwachsener	UK	Durchfall
489-36/84		Kind	Peru	Durchfall
488-36/84		Kind	Peru	Durchfall
490-36/84		Kind	Peru	Durchfall
492-36/84		Kind	Peru	Durchfall

**Fortsetzung Tab. 2b: Herkunft der *E.coli*-O118-Stämme vom Menschen**

Serovar	Stamm	Isoliert aus		Klinischer Status
		Altersgruppe	Land	
O118:H30	E-D 27	Unbekannt	Kanada	HUS
	E 355	Unbekannt	Kanada	Durchfall
	EC 930540	Erwachsener	Kanada	Durchfall
O118:NM	98-08935	Kind	D/Schlesw.-H.	HUS

**Tab. 2c: Herkunft der *E.coli*-Referenzstämme**

Serovar	Stamm	Isoliert aus		Klinischer Status	Referenz
		Altersgruppe	Land		
O157:H7	EDL933	Mensch	USA	HC	73
O26:H11	H19	Kind	UK	Durchfall	90
O26:H-	413/89-1	Kalb	D	Durchfall	114

\*: Stämme, die von demselben Patienten isoliert wurden, tragen die gleiche Anzahl von Sternchen

Abkürzungen: HC: Hämorrhagische Kolitis  
HUS: Hämolytisch-Urämisches-Syndrom  
NRW: Nordrhein-Westfalen  
NSA: Niedersachsen  
Rhl.-Pflz: Rheinland-Pfalz  
Schlesw.-H.: Schleswig-Holstein

### 3.2. Angewandte Untersuchungsmethoden

#### 3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in der PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH (Ebersberg, D) synthetisiert und anschließend auf eine Konzentration von 10 ng/μl verdünnt.

Für die Herstellung der Templates wurden die *E.coli*-Stämme über Nacht bei 37°C in LB-Medium angezchtet. 50 μl dieser Bakteriensuspension wurden mit 100 μl Aqua bidest gemischt und für 10 min. im Wasserbad hitzelysiert. Von diesem Ansatz wurden anschließend 5 μl als Matrize in die PCR eingesetzt.

Die Reaktionsansätze (25 μl) bestanden aus folgenden Reagenzien:

20 x <i>Tfl</i> -Puffer (Biozym, Hess. Oldendorf, D)	1,25	μl
Oligonukleotide (10 ng/μl, MWG, Ebersberg, D)	je 1,25	μl
Desoxynukleotide (4 mM, Sigma, Steinheim, D)	0,3125	μl
<i>Tfl</i> -Polymerase (1,0 U, Biozym, Hess. Oldendorf, D)	0,25	μl
DNS	5,0	μl
Aqua bidest	15,6875	μl

Die Ansätze wurden jeweils mit 20 μl Mineralöl (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D) überschichtet, kurz zentrifugiert und anschließend in einen DNS-Cycler (Eppendorf, Hamburg, D) verbracht.

Die Cyclerprogramme für die PCR's sind in **Tab. 3a** aufgelistet. Bei jeder PCR wurde als Positivkontrolle für das *stx*-, das *eae*- und das *fliC*-Gen der O157:H7 Referenzstamm EDL 933 und als Negativkontrolle Aqua bidest eingesetzt.

**Tab. 3b** gibt Aufschluß über die verwendeten Primerpaare.



**Tab. 3a: Reaktionsbedingungen der Polymerasekettenreaktion**

Nachgewiesenes Gen	Oligonukleotid-Primer	Anzahl der Zyklen	DNS-Denaturierung	Primer-Anlagerung	DNS-Amplifizierung
<b><i>eae</i></b>	ECW1/ECW2	1	94 °C, 300 sec.	64 °C, 90 sec	72 °C, 90 sec. 72 °C, 300 sec.
		30	94 °C, 60 sec.		
		1			
<b><i>stx1</i></b>	SK1/SK2	1	94 °C, 300 sec.	50 °C, 90 sec.	72 °C, 90 sec. 72 °C, 300 sec.
		30	94 °C, 60 sec.		
		1			
<b><i>stx2</i></b>	SK3/SK4	1	94 °C, 300 sec.	54 °C, 90 sec.	72 °C, 90 sec. 72 °C, 300 sec.
		30	94 °C, 60 sec.		
		1			
<b><i>fliC</i></b>	F-FLIC1/ R-FLIC2	1	94 °C, 300 sec.	53 °C, 120 sec.	72 °C, 180 sec. 72 °C, 300 sec.
		30	94 °C, 60 sec.		
		1			

Die Amplifikate der *fliC*-PCR wurden anschließend einer Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung unterzogen und mit der Restriktionsendonuklease *RsaI* über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Versuchsansatz (20 µl) für den Verdau beinhaltetete pro Probe:

PCR-Amplifikat	2 µl
10 x Puffer (One-Phor-All-buffer Plus, Pharmacia, Freiburg, D)	2 µl
<i>RsaI</i> (10 U, Pharmacia, Freiburg, D)	1,6 µl
Aqua bidest	14,4 µl

Anschließend wurden jeweils abwechselnd 20 µl der Restriktion neben 2 µl der PCR-Amplifikate auf ein 3,0 %iges Agarosegel aufgetragen und das erhaltene Bandenmuster ausgewertet.

Tab. 3b: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Gen	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)	Lage des Amplifikats <sup>1</sup> (Ref.)
<i>eae</i>	<b>ECW1</b> /sense	<b>TGC GGC ACA ACA GGC GGC GA</b>	495-1123 (41)
	<b>ECW2</b> /antisense	<b>CGG TCG CCG CAC CAG GAT TC</b>	
<i>stx1</i>	<b>SK1</b> /sense	<b>GAC TAC TTC TTA TCT GGA TTT</b>	470-1224 (21)
	<b>SK2</b> /antisense	<b>AAC GAA AAA TAA CTT CGC TG</b>	
<i>stx2</i>	<b>SK3</b> /sense	<b>CCG GGC GTT TAC GAT AGA CTT</b>	65-908 (45)
	<b>SK4</b> /antisense	<b>TGC AGC TGT ATT ACT TTC CC</b>	
<i>espP</i>	<b>pssA1</b> /sense	<b>TTG CGA AAA ATG GCG GAA CTC</b>	1417-2373 (60)
	<b>pssA3</b> /antisense	<b>CGG AGT CGT CAG TCA GTA GA</b>	
<i>fliC</i>	<b>F-FLIC1</b> /sense	<b>ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACC CAA C</b>	1-1495 (3)
	<b>R-FLIC2</b> /antisense	<b>CTA ACC CTG CAG CAG AGA CA</b>	

<sup>1</sup>: Die Positionen wurden entsprechend der Lage im jeweiligen offenen Leserahmen angegeben.

Das Gen *espP* wurde nicht in der PCR sondern nur durch DNS-DNS-Hybridisierung nachgewiesen.

### 3.2.1.1. Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis spezifisch amplifizierter DNS-Fragmente wurden Gele mit einer Konzentration von 1,5 % Agarose verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und dem Gemisch wurde 1 µg/µl Ethidiumbromid zugefügt. 10 µl der zu kontrollierenden Ansätze wurden mit 1,5 µl DNS-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte unter Mitführung eines Molekülgrößenstandards bei einer Spannung von 5 V/cm, bis die Bromphenolblau-Bande ca.  $\frac{3}{4}$  des Geles durchlaufen hatte. Anschließend wurde das Gel unter dem UV-Illuminator ausgewertet.

### 3.2.2. Hämolyse

Die Produktion von Hly<sub>EHEC</sub> wurde phänotypisch auf Waschblutagarplatten überprüft, indem die zu untersuchenden Isolate auf den Nährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

### 3.2.3. DNS-DNS-Hybridisierungsverfahren

#### 3.2.3.1. Herstellung von Gensonden

Die Markierung aller verwendeten Sonden erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP an Stelle von 2',5'-dTTP in der Polymerase-Kettenreaktion. **Tab. 4** zeigt die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes. Die übrigen Reaktionsbedingungen entsprachen denen der jeweiligen PCR. Nach der PCR-Amplifizierung konnte der Erfolg der Markierungsreaktion sowohl anhand des veränderten Laufverhaltens im Agarosegel-Elektropherogramm als auch durch Dot-Blot-Hybridisierung nachgewiesen werden.

**Tab. 4: Arbeitsprotokoll zur Synthese von Dig-11-dUTP markierten PCR-Amplifikaten für SK1/2, SK3/4, ECW1/2 bzw. pssA1/pssA3**

Reaktionsansatz (50 µl)	Volumen (µl)
Aqua bidest	25,75
20 x <i>Tfl</i> -Puffer (Biozym, Hess. Oldendorf, D)	2,5
2 Primer (MWG, Ebersberg, D)	je 2,5
<i>Tfl</i> -Polymerase (Biozym, Hess. Oldendorf, D)	0,5
dATP (10 mM, AGS, Heidelberg, D)	1,0
dCTP (10 mM, AGS, Heidelberg, D)	1,0
dGTP (10 mM, AGS, Heidelberg, D)	1,0
dTTP (10 mM, AGS, Heidelberg, D)	0,75
dig-UTP (Boehringer, Mannheim, D)	2,5
DNS	10,0

### 3.2.3.2. Dot-Blot

Für die Herstellung eines Dot-Blots wurde eine positiv geladene Nylonmembran zunächst in Aqua bidest und dann in 2 x SSC getaucht und anschließend auf ein mit Aqua bidest angefeuchtetes Filterpapier in den Dot-Blot-Apparat eingelegt. Das Gerät wurde an den Seiten luftdicht mit Parafilm verschlossen. Von den über Nacht in LB-Medium angezüchteten Proben wurden 50 µl mit 100 µl Aqua bidest gemischt und für 10 min. im kochenden Wasserbad hitzelysiert. Anschließend wurden die Proben auf die Nylonmembran aufpipettiert und mittels einer Wasserstrahlpumpe auf die Membran gesaugt. Nach Entnahme der Membran wurde die DNS durch 30-minütiges Backen bei 80 °C denaturiert und anschließend durch UV-Licht-Exposition in einem Crosslinker auf der Membran fixiert.

### 3.2.3.3. DNS-DNS-Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde zunächst mit 10 ml Hybridisierungslösung in einem verschraubbaren Glasröhrchen und unter ständigem Drehen für 1 h bei 45 °C prähybridisiert. Die markierte DNS-Sonde wurde für 10 min. im Wasserbad gekocht und anschließend mit 10 ml Hybridisierungslösung vermischt. Die Lösung im Glasröhrchen wurde gegen diese Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Nylonmembran über Nacht unter ständigem Drehen bei 45 °C hybridisiert.

Die Membran wurde am nächsten Tag aus dem Glasröhrchen herausgenommen und in einer verschließbaren Plastikschale erst zweimal 5 min. bei RT in Waschlösung I, dann zweimal 15 min. bei 55 °C in Waschlösung II gewaschen, um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen.

Die folgenden Schritte wurden unter gleichmäßigem Schwenken bei RT durchgeführt:

Die Membran wurde 5 min. im Waschpuffer gewaschen und dann 45 min. in Puffer 2 geblockt. Nach dem Blockieren wurde die Membran für weitere 45 min. mit dem Anti-Dig-AP-Fab-Fragment in einer Verdünnung von 1:10000 in Puffer 2 inkubiert. Die Antikörperlösung wurde in zwei fünfzehnminütigen Waschschritten im Waschpuffer von der Membran abgewaschen. Nach einer kurzen Äquilibrierung in Puffer 3 wurde der Membran zur Detektion 10 ml Lumigen PPD/CSPD in einer Verdünnung von 1:100 in Puffer 3 zugesetzt.

Anschließend wurde die Membran in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und für 10 min. bei 37 °C inkubiert.

Der eingeschweißte Blot wurde dann für eine Expositionszeit von 1 h zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gelegt. Anschließend wurde der Röntgenfilm 5 min. in Entwickler geschwenkt, kurz mit Wasser abgespült und für weitere 5 min. in Fixierlösung fixiert. Hatte eine DNS-DNS-Hybridbildung stattgefunden, so konnte diese anhand der Chemolumineszenz-Reaktion und der dadurch bewirkten Schwärzung des Röntgenfilms nachgewiesen werden.

### **3.2.4. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

(Methode nach B. Liebisch und S. Schwarz), (56)

#### **1. Tag**

Die zu untersuchenden Stämme wurden durch Beimpfen von jeweils 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 U/min im Schüttelinkubator angezüchtet.

#### **2. Tag**

Zur photometrischen Bestimmung der Optischen Dichte (OD) wurde zunächst der Leerwert zweier mit sterilem LB-Medium (LBM) gefüllten Küvetten auf eine OD von 0,0 bei 578 nm eingestellt. Anschließend wurde die Extinktion der Übernachtskultur gemessen und durch Verdünnung mit LB-Medium auf eine Ziel-OD von 0,3 in 5 ml LBM eingestellt

Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde in einer Zentrifuge bei 4 °C und 4000 rpm (3291 g) für 15 min. zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml kaltem Pett IV-Puffer resuspendiert, die Probe gevortext und der beschriebene Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde durch sorgfältiges Absaugen mit einer Pipette erneut abgenommen und verworfen. Das so erhaltene Pellet wurde vollständig in 0,5 ml Pett IV-Puffer resuspendiert und zunächst auf Eis gekühlt.

Zum Gießen der Agaroseblöckchen wurde eine mit Aqua Bidest hergestellte 1,5 %ige Agaroselösung verwendet, die nach dem Aufkochen durch Aufbewahrung in einem 56 °C warmen Wasserbad flüssig gehalten wurde. Die Bakteriensuspension wurde durch kurzes Schwenken im 56 °C-Wasserbad aufgewärmt, mit 0,5 ml warmer Agarose vermischt und anschließend mit einer 1 ml-Pipette luftblasenfrei in die gereinigten Gießförmchen überführt. Die Förmchen wurden zum Abkühlen für 10 min. in den Kühlschrank gestellt.

Die erstarrten Agaroseblöckchen wurden in ein 10 ml Plastikröhrchen mit 3 ml Lyselösung gegeben und für 2 h bei 37 °C in Schräglage (zur Verbesserung der Diffusion) ohne Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubation wurde durch vorsichtiges Abgießen die Lyselösung verworfen und durch 3 ml ESP-Lösung ersetzt. Die Inkubation der Blöckchen erfolgte über Nacht bei 56 °C im Wasserbad.

### **3. Tag**

Nach Abgießen des ESP-Puffers wurden die Blöckchen mit 3 ml Aqua bidest gewaschen und anschließend für 15 min. bei Raumtemperatur sanft geschwenkt (57 U/min).

Zur Vorbereitung des TE-PMSF-Puffers wurden pro Probe jeweils 30 µl 100 mM PMSF in zwei Eppendorf-Cups überführt und eins davon in den Kühlschrank zurückgelegt. Kurz vor Verwendung des o.g. Puffers wurde das zweite PMSF-Cup 2-4 min. bei 56 °C erwärmt, bevor es zu je 2 ml TE pro Probe gegeben wurde (Zielkonzentration: 15 µg/ml TE).

Nach dem Abgießen des Aqua bidest wurden 2 ml des TE-PMSF-Gemisches in jedes Probenröhrchen überführt und dieses waagrecht sanft für 30 min. bei Raumtemperatur geschwenkt.

Dieser Waschschrift wurde mit dem ersten PMSF-Cup aus dem Kühlschrank wiederholt und die Probe abermals für 30 min. bei Raumtemperatur geschwenkt.

Nach erneutem Abgießen des TE-PMSF-Puffers wurde dieser durch 3 ml Aqua bidest ersetzt und die Proben für weitere 15 min. bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach Entfernen des Aqua bidest, wurden erneut 3 ml TE hinzugefügt und die Blöckchen für 30 min. bei RT geschwenkt. Nach Wiederholung dieses Vorgangs wurden 5 ml TE zupipettiert, und die Probe über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 4. Tag

Nach Beschriftung zweier neuer Eppendorf-Cups pro Probe wurden in das erste Cup 225  $\mu$ l Aqua bidest und 25  $\mu$ l 10 x Puffer (enzymspezifisch) gefüllt und diese Äquibrierungslösung sorgfältig gevortext. In das zweite Cup wurden 900  $\mu$ l TE pipettiert.

Nach Abkippen des TE-Puffers wurde ein Blöckchen mit einer umgebogenen Pasteurpipette auf einen Objektträger überführt. Von diesem Blöckchen wurden mit einem Skalpell zwei ca. 2 x 5 mm große Stückchen abgeschnitten, mittels Pasteurpipette in die Äquibrierungslösung überführt und 1 h bei RT inkubiert.

Die übrigen Blöckchen wurden im TE-gefüllten Cup bei 4 °C aufbewahrt.

Restriktionsansatz:	<i>BlnI</i>	<i>XbaI</i>
10 x Puffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Enzymmenge	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Aqua bidest	44 $\mu$ l	43 $\mu$ l

Der Äquibrierungspuffer wurde vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette abgesaugt und durch 50  $\mu$ l Enzymlösung ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Verdaus für 4 h bei 37 °C.

#### Vorbereitung der PFGE-Kammer und des Gels:

Kamm und Gelträger wurden mit Ethanol gereinigt. Die PFGE-Kammer wurde mit 2,5 l 0,5 x TBE gefüllt, das bei 14 °C gekühlt wurde. Es wurde ein 1 %iges Gel gegossen, indem 2,0 g Agarose mit 200 ml 0,5 x TBE- Puffer vermischt wurden.

Nach Ablauf des Verdaus wurde das Blöckchenstück mit einer umgebogenen Pasteurpipette auf eine Skalpellklinge gebracht und an der Vorderwand des Slots positioniert. Anschließend wurde ein Molekülgrößenstandard aufgetragen, und die Slots wurden mit flüssiger Agarose verschlossen.



Tab. 5: Programm: Chef-DR II

	<i>BInl</i>	<i>Xbal</i>
<b>Block 1</b>	Run time: 11 h	Run time: 11 h
State 1	Initial time: 7 sec Final time: 12 sec 5,5 V/cm 60 °	Initial time: 7 sec Final time: 12 sec 5,5 V/cm 60 °
State 2	Initial time: 7 sec Final time: 12 sec 5,5 V/cm -60 °	Initial time: 7 sec Final time: 12 sec 5,5 V/cm -60 °
<b>Block 2</b>	Run time: 11 h	Run time: 13 h
State 1	Initial time: 20 sec Final time: 65 sec 5,5 V/cm 60 °	Initial time: 20 sec Final time: 40 sec 5,5 V/cm 60 °
State 2	Initial time: 20 sec Final time: 65 sec 5,5 V/cm -60 °	Initial time: 20 sec Final time: 40 sec 5,5 V/cm -60 °

Nach Ablauf der Laufzeit wurde das Gel 4 min. im Ethidiumbromidbad gefärbt (Stocklösung: 10 mg/ml, Zielkonzentration: 100 µl/l Wasser) und anschließend für 15 min. in Leitungswasser entfärbt.

Die Auswertung der Gele erfolgte computergestützt mit dem Programm GelCompar<sup>®</sup> der Firma Applied Maths (Kortrijk, Belgien).

### 3.3. Verwendete Materialien

#### 3.3.1. Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

<b>Luria-Bertani-Bouillon</b>	Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g	Merck GmbH, Darmstadt, D
	Hefe-Extrakt	5,0 g	Difco, Augsburg, D
	Bacto-Trypton	10,0 g	Difco, Augsburg, D
	Natriumhydroxid (NaOH) 1 M	4,0 ml	Merck GmbH, Darmstadt, D
	Aqua bidest	ad 1000 ml	
<b>Schafblut-Agar</b>	Blut-Agar (Basis), defibriniertes Schafblut	10 %	Merck GmbH, Darmstadt, D
<b>Waschblut-Agar</b>	Tryptose-Blut-Agar (Basis), defibriniertes und dreimal in 1 x PBS gewaschenes Schafblut	10 %	Oxoid GmbH, Wesel, D

#### 3.3.2. Reagenzien für DNS-Methoden

##### DNS-Fällung:

<b>Phenol</b>	Rotiphenol®		Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
<b>Choroform</b>	A.C.S. Reagenz	99,8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
<b>Isoamylalkohol</b>	pro analysi		Merck GmbH, Darmstadt, D
<b>Ethanol</b>	absolut pro analysi		Merck GmbH, Darmstadt, D

**Agarosegelelektrophorese:**

<b>TAE-Puffer (10-fach)</b>	Tris-Base	48,50 g/l	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
	Natriumacetat	72,20 g/l	Merck GmbH, Darmstadt, D
	Na-EDTA pH 8,0	0,38 g/l	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
<b>Agarose</b>	NEEO Ultra Qualität		Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
<b>Ethidium- bromid</b>	aqueous solution	1 % w/v	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
<b>6 x Gel loading buffer</b>	Bromphenolblau Na-salz	25 %	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
	Ficoll	15 %	Pharmacia Life Science, Freiburg, D
<b>1 kb Ladder</b>			Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein, D

## Lösungen und Materialien für die DNS-DNS-Hybridisierung:

<b>Hybridisierungs- lösung</b>	50 % (v/v) Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
	25 % (v/v) 20 x SSC:	
	0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck GmbH, Darmstadt, D
	3 M NaCl (pH 7,0)	Merck GmbH, Darmstadt, D
	2 % (v/v) Blockierungsreagenz	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
	0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
	0,02 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe D
<b>Waschlösung I</b>	2 x SSC	Merck GmbH, Darmstadt, D
	0,1 % (w/v) SDS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe D
<b>Waschlösung II</b>	0,1 x SSC	Merck GmbH, Darmstadt, D
	0,1 % (w/v) SDS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe D
<b>Waschpuffer</b>	0,3% (v/v) Tween <sup>®</sup> 20 in Puffer I	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
<b>Puffer I</b>	0,1 M Maleinsäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
	0,15 M NaCl pH 7,5	Merck, Darmstadt, D
<b>Puffer II</b>	1 % (w/v) Blockierungsreagenz in Puffer I	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
<b>Puffer III</b>	0,1 M Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
	0,1 M NaCl	Merck GmbH, Darmstadt, D
	50 mM Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) pH 9,5	Merck GmbH, Darmstadt, D

### Fortsetzung: Lösungen und Materialien für die DNS-DNS-Hybridisierung:

<b>Digoxigenin-11-dUTP</b>		Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
<b>Anti-Digoxigenin-AP-F<sub>ab</sub>-Fragmente</b>		Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
<b>CSPD<sup>®</sup> Chemiluminescence Substrate</b>		Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
<b>Nylon Membranes</b>	positively charged	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D
<b>Hyperfilm-ECL</b>	RPN 3114, 8x10''	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
<b>Entwickler</b>	Variospeed W	Tetanal Photowerk GmbH & Co., Norderstedt, D
<b>Fixierer</b>	Acidofix Schnellfixiersalz	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen, D

### Agarose für die Pulsfeldgelelektrophorese:

<b>Molecular Biology Certified Agarose</b> (Ultra Pure Grade Agarose 100 g)		Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<b>Agarose Chromosomal Grade</b>		Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<b>Lambda Ladder PFG Marker</b>		New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, D

## Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese:

<b>Pett IV Puffer</b>	1 M NaCl	Merck GmbH, Darmstadt, D
	10 mM Tris pH 8,0	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
	10 mM Di-Na-EDTA	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
<b>Lysepuffer</b>	1 M NaCl	Merck GmbH, Darmstadt, D
	10 mM Tris pH 8,0	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
	200 mM Di-Na-EDTA	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
	0,5 % N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
	0,2 % Desoxycholsäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz
	10 mg/ml RNAse (Zielkonzentration 2 µl/ml)	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
	50 mg/ml Lysozym (Zielkonzentration 1 mg/ml)	Sigma-Alldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
<b>ESP-Puffer</b>	0,5 M Di-Na-EDTA	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
	pH 9,0	
	1 % N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
	20 mg/ml Proteinase K (Zielkonzentration 0,65 mg/ml, kurz vor Gebrauch zufügen)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D

**Fortsetzung: Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese:**

<b>TE</b>	10 mM Tris pH 8,0	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
	1 mM Di-Na-EDTA	Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg, D
<b>Phenylmethyl- sulfonylfluoride (PMSF)</b>	100 mM (Zielkonzentration 1,5 mM in TE)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
<b>10 x TBE</b>	0,9 M Tris pH 8,0	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
	0,9 M Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
	20 mM EDTA (Na-frei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D

**Enzyme:**

<b><i>BlnI</i></b>	8 U/μl	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
<b><i>XbaI</i></b>	10 U/μl	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, D
<b><i>RsaI</i></b>	6 U/μl	Pharmacia Life Science, Freiburg, D

### 3.3.3. Verwendete Geräte

Bio-Dot Apparatus®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Bio-Rad Chef Mapper Chef-DR® II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Eppendorf Mastercycler 5330	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Glasröhrchen	Kalensee GmbH, Gießen, D
Herolab E.A.S.Y. RH UVT-20M/W Enhanced Analysis System	Herolab GmbH Laborgeräte Wiesloch, D
Hettich Zentrifuge Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
Hybaid Maxi Oven	Hybaid GmbH, Heidelberg, D
Schüttelinkubator GFL 3032	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
UV Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg, D
Uvikon® 810 Photometer	Kontron AG, Zürich, Schweiz



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung Shigatoxin-bildender *E.coli*-Feldstämme der Sero- gruppe O118

#### 4.1.1. Nachweis der Shigatoxin-Gene (*stx1*, *stx2*)

Die Identifizierung der 100 Stämme als Shigatoxin-bildende *E.coli* (STEC) erfolgte durch den Nachweis des Shigatoxin-Gens (*stx*) sowohl mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als auch anhand von Desoxyribonukleotid- (DNS-) Sonden in der Dot-Blot-Hybridisierung. Die Verwendung spezifischer DNS-Sonden (**SK1/2** für *stx1* und **SK3/4** für *stx2*) ermöglichte die Differenzierung der beiden Shigatoxin-Varianten *stx1* und *stx2*.

So konnten anhand dieser Untersuchungen 89 *stx*-positive Stämme (89 %) identifiziert werden, darunter 63 (70,8 %) vom Rind, 25 (28,1%) vom Menschen und einer (1,1 %) von einer Ziege.

Mit Ausnahme von vier Stämmen, die zusätzlich das *stx2*-Gen aufwiesen, besaßen alle übrigen 59 (93,7 %) Isolate vom Rind das *stx1*. Die Isolate RW 1299 und RW 2199 haben im Laufe ihrer Kultivierung das *stx1*, Stamm RW 2297 das *stx2* verloren. Zwei Stämme waren *stx*-negativ.

Von den 25 *stx*-positiven Isolaten humaner Herkunft verfügten 16 (64,0 %) über das *stx1* und neun (36,0 %) über das *stx2*. Bei den vier aufgeführten *stx*-negativen Isolaten handelte es sich um die ETEC-Stämme aus Peru.

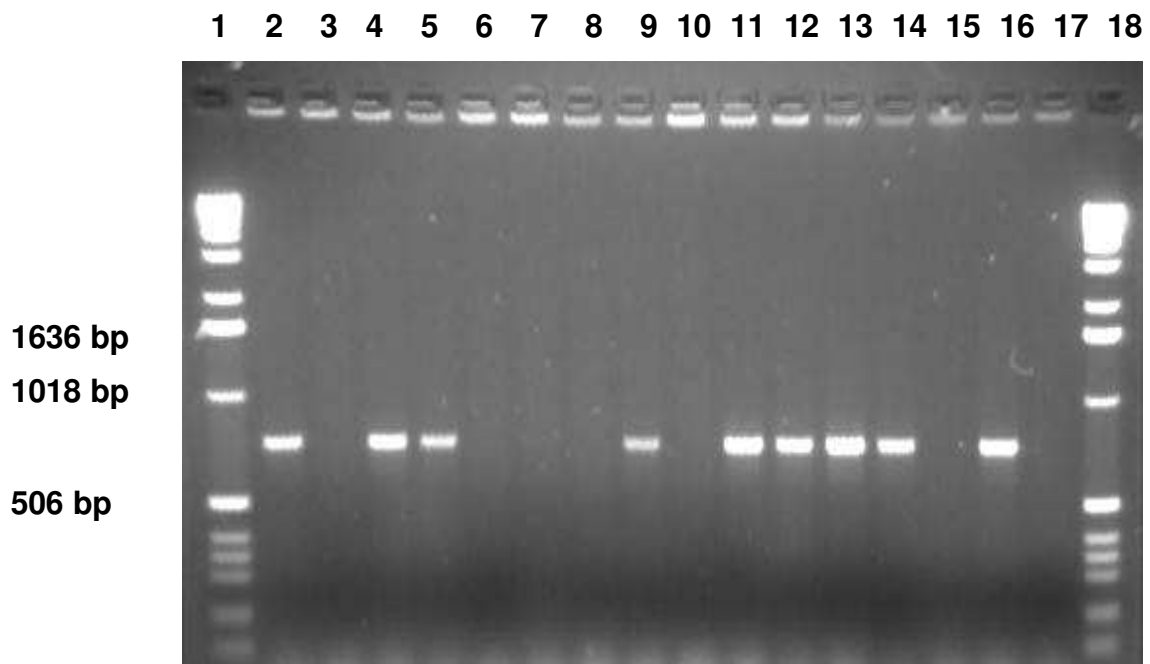
Die fünf Stämme vom Schwein waren *stx*-negativ, und der Stamm der untersuchten Ziege *stx1*-positiv.

In **Tab. 6** sind die *stx*-Genotypen der untersuchten Spezies aufgeführt.

**Tab. 6: Nachweis der *stx*-Genotypen bei *E.coli*-O118-Stämmen verschiedener Spezies**

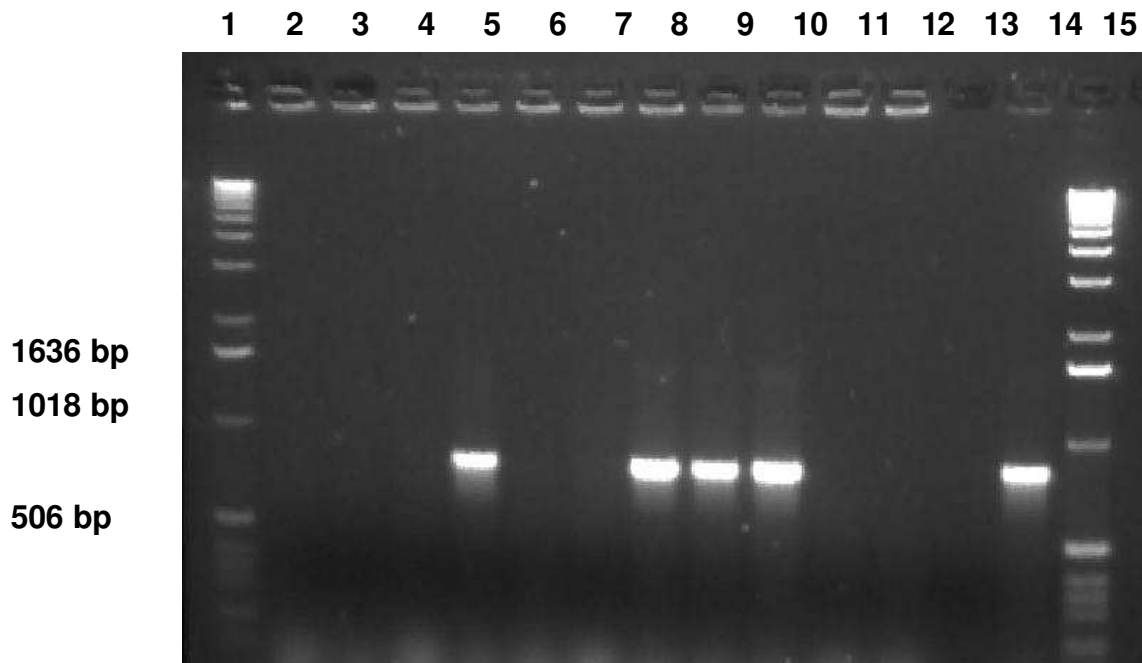
Spezies	Anzahl der Stämme mit dem Genotyp							
	<i>stx1</i>	%	<i>stx2</i>	%	<i>stx1/2</i>	%	kein <i>stx</i>	%
Mensch (n=29)	16	55,2	9	31,0	-	-	4	13,8
Rind (n=65)	59	90,8	-	-	4	6,2	2	3,1
Schwein (n=5)	-	-	-	-	-	-	5	100,0
Ziege (n=1)	1	100,0	-	-	-	-	-	-

**Abb. 5a** und **5b** zeigen Elektropherogramme, auf denen die PCR-Amplifikate für das *stx1*- bzw. das *stx2*-Gen sichtbar werden. Als Positivkontrolle wurde der O157:H7 Referenzstamm EDL 933 verwendet, als Negativkontrolle diente Aqua bidest. Die erwartete Größe der Amplifikate betrug beim *stx1*-Gen 654 bp und beim *stx2*-Gen 843 bp. Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsstandard (1 kb Ladder, Gibco, Eggenstein, D) herangezogen.



**Abb. 5a: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *stx1*-Gens bei *E.coli*-O118-Isolaten (1,5 %iges Agarosegel, 100V)**

Spur (1) und (18) 1kb-Ladder; (2) EC910017; (3) P86-82C; (4) EC910224; (5) EC920287; (6) E29558/0; (7) P85-347/A; (8) EC930540; (9) EC970130; (10) VTB110; (11) VTB113; (12) VTH28; (13) VTH62; (14) VTF205; (15) E40841/0; (16) H19; (17) EDL 933; (18) Aqua bidest



**Abb. 5b: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *stx2*-Gens bei *E.coli*-O118-Isolaten (1,5 %iges Agarosegel, 100V)**

Spur (1) und (15) 1kb-Ladder; (2) EC910155; (3) EC920379; (4) EC920433; (5) EC930540; (6) P86-82C; (7) H19; (8) E40829/0; (9) E25702/0; (10) E29558/0; (11) CB5482; (12) CB5483; (13) Aqua bidest; (14) EDL 933

#### 4.1.2. Nachweis des EHEC-Hämolymins ( $Hly_{EHEC}$ )

Durch Ausstreichen der Stämme auf Schafblutagarplatten, die gewaschene Erythrozyten enthielten (Waschblutagar), konnte bei der Mehrzahl der untersuchten Stämme die Produktion des EHEC-Hämolymins ( $Hly_{EHEC}$ ) phänotypisch nachgewiesen werden. Stämme, die das  $Hly_{EHEC}$  besitzen, bilden, im Gegensatz zur klaren, vollständigen Alpha-Hämolyse lediglich eine schmale Zone vollständiger Hämolyse um die Kolonien aus, an den sich ein breiter Saum unvollständiger Hämolyse anschließt.

Insgesamt war das  $Hly_{EHEC}$  bei 77 (77 %) Isolaten nachweisbar (**Tab. 7**), darunter waren 60 (77,9 %) Isolate vom Rind, 16 (20,8 %) Isolate vom Menschen und ein (1,3 %) Stamm von einer Ziege.

**Tab. 7: Nachweis der Bildung des EHEC-Hämolymins ( $Hly_{EHEC}$ ) auf Waschblutagarplatten**

$Hly_{EHEC}$ -Phänotyp		Anzahl der Stämme mit dem Genotyp							
		<i>stx1</i>		<i>stx2</i>		<i>stx1/2</i>		kein <i>stx</i>	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Mensch n=29	positiv	16	55,2	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	9	31,0	-	-	4	13,8
Rind n=65	positiv	55	84,6	-	-	4	6,2	1	1,5
	negativ	4	6,2	-	-	-	-	1	1,5
Schwein n=5	positiv	-	-	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	-	-	-	-	5	100,0
Ziege n=1	positiv	1	100,0	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.1.3. Nachweis des *E.coli* “attaching and effacing”-Gens (*eae*)

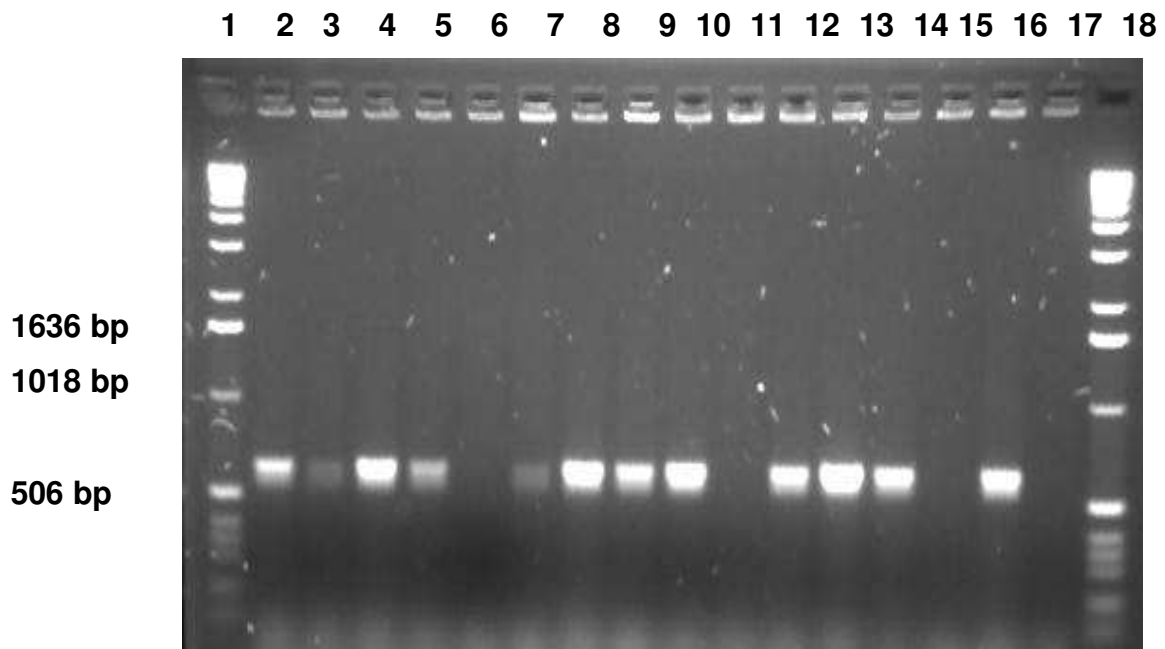
Die Stämme wurden unter Verwendung des Oligonukleotidpaares **ECW1/2** in der PCR auf das Vorhandensein des “attaching and effacing”-Gens (*eae*) untersucht. Die entstandenen PCR-Amplifikate wiesen eine Größe von 629 bp auf. Als Positivkontrolle diente der O157:H7 Referenzstamm EDL 933 und als Negativkontrolle Aqua bidest.

Von den untersuchten 100 Stämmen verfügten 84 (84 %) über das für die Ausbildung der A/E-Läsion verantwortliche *eae*-Gen (**Tab. 8**). 64 (76,2 %) dieser Isolate stammten vom Rind, 19 (22,6 %) vom Menschen und eines (1,2 %) von einer Ziege.

**Tab. 8: Nachweis des *E.coli* “attaching and effacing”-Gens (*eae*) bei *E.coli*-O118-Stämmen**

<i>eae</i> -Genotyp		Anzahl der Stämme mit dem Genotyp							
		<i>stx1</i>		<i>stx2</i>		<i>stx1/2</i>		kein <i>stx</i>	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Mensch n=29	positiv	16	55,2	3	10,3	-	-	-	-
	negativ	-	-	6	20,7	-	-	4	13,8
Rind n=65	positiv	59	90,8	-	-	4	6,2	1	1,5
	negativ	-	-	-	-	-	-	1	1,5
Schwein n=5	positiv	-	-	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	-	-	-	-	5	100,0
Ziege n=1	positiv	1	100,0	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-

**Abb. 6** zeigt ein Elektropherogramm mit den entsprechenden *eae*-PCR-Amplifikaten. Auch hier wurde als Molekulargrößenstandard der 1 kb Ladder der Firma Gibco, Eggenstein, D verwendet.



**Abb. 6: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *eae*-Gens bei *E.coli*-O118-Isolaten (1,5 %iges Agarosegel, 100V)**

Spur (1) und (18) 1kb-Ladder; (2) EC910017; (3) EC910155; (4) EC910224; (5) EC920287; (6) P86-82C; (7) EC920433; (8) EC930540; (9) EC970130; (10) VTB110; (11) E29558/0; (12) VTH28; (13) VTH62; (14) VTF205; (15) E40841/0; (16) EDL 933; (17) Aqua bidest

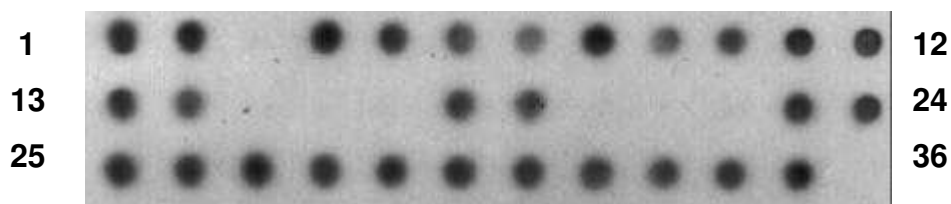
#### 4.1.4. Nachweis der sezernierten Protease (EspP)

Die Stämme wurden zusätzlich durch einen DNS-DNS-Hybridisierungsversuch mit der DNS-Sonde pssA1/A3 auf das Vorkommen der sezernierten Protease EspP untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß 74 Stämme (74 %) über diese Protease verfügten (**Tab. 9**). Darunter waren 57 (77,0 %) Isolate vom Rind, 16 (21,6 %) vom Menschen und eines (1,4 %) von einer Ziege.

**Tab. 9: Nachweis der Protease EspP bei *E.coli*-O118-Stämmen  
(DNS-DNS-Hybridisierung mit der Sonde pssA1/A3)**

EspP		Anzahl der Stämme mit dem Genotyp							
		<i>stx1</i>		<i>stx2</i>		<i>stx1/2</i>		kein <i>stx</i>	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Mensch n=29	positiv	16	55,2	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	9	31,0	-	-	4	13,8
Rind n=65	positiv	52	80,0	-	-	3	4,6	2	3,1
	negativ	7	10,8	-	-	1	1,5	-	-
Schwein n=5	positiv	-	-	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	-	-	-	-	5	100,0
Ziege n=1	positiv	1	100,0	-	-	-	-	-	-
	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-

**Abb. 7** zeigt ein Dot-Blot-Autoluminogramm nach DNS-DNS-Hybridisierung mit der Sonde pssA1/pssA3. Die positiven Stämme waren durch die Schwärzung des Röntgenfilmes deutlich von den negativen Stämmen unterscheidbar.



**Abb. 7: Dot-Blot-Autoluminogramm zum Nachweis des Serinproteasesgens *espP***

Spur (1) CB5482; (2) CB5483; (3) CB6069; (4) CB 6175; (5) CB6236; (6) CB6365; (7) CB6366; (8) D1154/10; (9) 173a433917-1; (10) 173a433917-2; (11) 173a103531-1; (12) 173a103531-7; (13) 31W/Orskov; (14) 340; (15) 488-36/84; (16) 490-36/84; (17) 492-36/84; (18) 666/89; (19) E-D143; (20) E-D27; (21) E355; (22) EH101; (23) EH78; (24) GS1161-1; (25) GS1180-1; (26) GS1181-1; (27) GS1205-1; (28) GS1232-1; (29) GS1236-1; (30) 340S89; (31) 341S89; (32) 342S89; (33) 347S89; (34) 363S89; (35) EDL 933; (36) Aqua bidest

#### **4.1.5. Überprüfung der Sensitivität der angewandten PCR durch DNS-DNS-Hybridisierung**

Zur Überprüfung der Sensitivität der Polymerase-Kettenreaktion wurden die Proben zusätzlich mit der Methode der DNS-DNS-Hybridisierung auf das Vorhandensein von *stx*- bzw. *eae*-Genen untersucht.

Die Markierung der **SK1/2**-, **SK3/4**- sowie **ECW1/2**- Amplifikate erfolgte während der PCR durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP. Als Matritze für die zu synthetisierenden DNS-Sonden diente DNS des O157:H7 Referenzstammes EDL 933. Die Ergebnisse, die durch die PCR erzielt wurden, konnten für alle Stämme auch in der DNS-DNS-Hybridisierung bestätigt werden.

Eine statistische Berechnung der Häufigkeitsverteilungen bzw. Signifikanzen zwischen den Merkmalen *stx-eae*, *stx*-Hly<sub>EHEC</sub> und *stx*-EspP konnte nicht erfolgen, da die Grundgesamtheit der untersuchten Stämme nicht alle Voraussetzungen für den Einsatz des  $\chi^2$ -Vierfeldertests erfüllte.

#### **4.1.6. Zusammenfassende Darstellung der Virulentypisierung**

Da ein Ziel der hier unternommenen Untersuchungen die Klärung der Frage war, ob es sich bei den beim Rind gefundenen STEC-Isolaten um potentielle EHEC handelt, wurde besonderes Augenmerk auf das gleichzeitige Vorkommen aller drei EHEC-



typischen virulenzassoziierten Faktoren (*stx*, Hly<sub>EHEC</sub>, *eae*) gerichtet. **Tab. 10** gibt Aufschluß über die bei den verschiedenen Spezies gefundenen virulenzassoziierten Faktoren sowie den Gesundheitsstatus der untersuchten Patienten. In **Tab. 11** sind alle Kombinationsmöglichkeiten der Virulenzmerkmale *stx*, *eae*, Hly<sub>EHEC</sub> und EspP aufgelistet. Hier wurden alle Spezies im Vergleich untersucht, wobei die Zeichen “+” für ein vorhandenes und “-” für ein fehlendes Merkmal stehen. Eine ausführliche Auflistung aller untersuchten Stämme, ihrer Serovare, Anamnesen sowie gefundenen Virulenzfaktoren vermitteln **Tab. 12a, b, c**.

**Tab. 10: Nachweis EHEC-typischer virulenzassoziierter Faktoren bei *E.coli*-O118-Stämmen verschiedener Spezies**

Herkunft der Stämme		Anzahl der Stämme					
		untersucht	positiv				
Spezies	Status		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/2</i>	<i>eae</i>	Hly <sub>EHEC</sub>
Mensch (n= 29)	gesund	-	-	-	-	-	-
	krank	27	14	9	-	17	14
	unbekannt	2	2	-	-	2	2
Rind (n= 65)	gesund	15	12	-	2	15	14
	krank	47	44	-	2	46	43
	unbekannt	3	3	-	-	3	3
Schwein (n= 5)	gesund	-	-	-	-	-	-
	krank	3	-	-	-	-	-
	unbekannt	2	-	-	-	-	-
Ziege (n= 1)	gesund	-	-	-	-	-	-
	krank	1	1	-	-	1	1
	unbekannt	-	-	-	-	-	-
Gesamt		100	76	9	4	84	77

Hieraus ergab sich, daß bei 76 (76 %) der 100 untersuchten Stämme alle drei EHEC-typischen virulenzassoziierten Faktoren gefunden werden konnten. Die Mehrzahl dieser Patienten war krank. Betrachtete man nur die Stämme vom Rind (n=65), so verfügten 59 (90,8 %) Isolate über das *stx*-Gen, das Hly<sub>EHEC</sub> und das *eae*-Gen. Interessante Ergebnisse erbrachte auch die Untersuchung der Kombinationen verschiedener Virulenzmerkmale (**Tab. 11**). So konnte festgestellt werden, daß der weitaus größte Teil aller Rinder (54/65, 83,1%) die Merkmalskombinationen *stx*+, *eae*+, Hly<sub>EHEC</sub>+ und EspP+ besaßen, während diese Kombination beim Menschen nur in 16 von 29 Fällen (55,2%) gefunden wurde. Alle übrigen Kombinationen wiesen viel geringere Häufigkeiten auf. Die fünf Isolate vom Schwein verfügten über keine der untersuchten Merkmale, während der eine Ziegenstamm alle Virulenzfaktoren aufwies.

**Tab. 11: Vorkommen der Kombinationen verschiedener Virulenzmerkmale bei *E.coli*-O118-Stämmen**

Merkmalskombinationen				Anzahl positiver Stämme				
<i>stx</i>	<i>eae</i>	Hly <sub>EHEC</sub>	EspP	Gesamt	Mensch	Rind	Schwein	Ziege
+	-	-	-	6	6	0	0	0
+	+	-	-	7	3	4	0	0
+	+	+	-	4	0	4	0	0
+	+	+	+	71	16	54	0	1
-	-	-	-	8	3	0	5	0
-	+	-	-	0	0	0	0	0
-	+	+	-	0	0	0	0	0
-	+	+	+	1	0	1	0	0
+	-	+	-	0	0	0	0	0
+	-	+	+	0	0	0	0	0
+	-	-	+	0	0	0	0	0
+	+	-	+	1	0	1	0	0
-	+	-	+	0	0	0	0	0
-	-	+	+	0	0	0	0	0
-	-	-	+	2	1	1	0	0
-	-	+	-	0	0	0	0	0
Gesamt				100	29	65	5	1

**Tab. 12a: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von bovinen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=65)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:H16	RW2303**	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2126**	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW0203	Kalb	D/NRW	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	GS1181-1	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2199 <sup>1</sup>	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i> <sup>1</sup>	+	+	+
	666/89	Kalb	D/Bayern	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2022	Kalb	D/RhIPfz	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1306***	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1912	Kalb	D/NRW	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1362	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1303****	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1366	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1319	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1305	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+

**Fortsetzung Tab.12a: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von bovinen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=65)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:H16	RW1817	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1307***	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1318	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1299 <sup>1</sup>	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i> <sup>1</sup>	+	+	+
	RW1304****	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2017	Kalb	D/RhLPflz	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW1365	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2039	Kuh	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2173	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2266	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	-
	RW2125	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	-	+
	340	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW0136	Kalb	Schweiz	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2116	Kuh	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	-

**Fortsetzung Tab.12a: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von bovinen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=65)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:H16	RW2136	Kuh	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2297 <sup>2</sup>	Kuh	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1/2</i> <sup>2</sup>	+	+	-
	RW1911	Kalb	D/Rhlpflz	Durchfall	<i>stx1/2</i>	+	+	+
O118:H16	GS1236-1* <sup>3</sup>	Kalb	D/Hessen	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	GS1232-1	Kalb	D/Hessen	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	GS1161-1*	Kalb	D/Hessen	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	GS1180-1	Kalb	D/Hessen	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	GS1205-1	Kalb	D/Hessen	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	D1154/10	Kalb	D/Bayern	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	EC910155	Kalb	Kanada	unbekannt	<i>stx1</i>	+	+	+
	EC910224	Kalb	Kanada	unbekannt	<i>stx1</i>	+	+	+
EC920379	Kalb	Kanada	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+	

**Fortsetzung Tab.12a: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von bovinen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=65)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:H16	340S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	341S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	342S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	347S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	363S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	364S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	367S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	-
	365S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	-	-
	366S89	Kalb	Belgien	Durchfall	<i>stx1</i>	+	-	-
	EC920433	Kalb	Kanada	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	-	-
	EC910017	Kalb (Fleisch)	Kanada	Durchfall	<i>stx1</i>	+	-	-
O118:NM	557/89	Kalb	D/Bayern	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2311	Kuh	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+

**Fortsetzung Tab.12a: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von bovinen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=65)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:NM	RW1302	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	RW2030	Kalb	D/Hessen	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	173a103531-1	Kuh	D/Bayern	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	173a103531-7	Kuh	D/Bayern	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	173a433917-1	Kuh	D/Bayern	o.b.B.	<i>stx1/2</i>	+	+	+
	173a433917-2	Kuh	D/Bayern	o.b.B.	<i>stx1/2</i>	+	+	+
	EC920287	Kalb	Kanada	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
O118:H-	31W/Orskov <sup>4</sup>	Kalb	Schweden	Septikämie	-	-	-	+
O118:H16	WK100-1/88	Kalb	Schweiz	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	VTB113	Kalb	Spanien	o.b.B.	<i>stx1</i>	+	+	+
	VTB110	Kuh	Spanien	o.b.B.	-	+	+	+
	VTF205	Kalb (Fleisch)	Spanien	unbekannt	<i>stx1</i>	+	+	+

**Tab. 12b: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von einem caprinen und fünf porcinen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:NM	Zg56-1/90	Ziege	Schweiz	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
O118:H9	P85-285	Schwein	Kanada	Rhinitis, Gastroenteritis	-	-	-	-
	P85-347A	Schwein	Kanada	unbekannt	-	-	-	-
	P85-1219A1	Schwein	Kanada	unbekannt	-	-	-	-
	P85-2112	Schwein	Kanada	Polyarthritits	-	-	-	-
O118:NM	P86-82C	Schwein	Kanada	Durchfall	-	-	-	-

<sup>1</sup>: Stamm hat *stx1* während der Kultivierung verloren.

<sup>2</sup>: Stamm hat *stx2* während der Kultivierung verloren.

<sup>3</sup>: Stämme, die von demselben Patienten isoliert wurden, tragen die gleiche Anzahl von Sternchen

<sup>4</sup>: O118 Serotyp Referenzstamm

<sup>5</sup>: Stämme sind ETEC



**Tab. 12c: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von humanen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=29)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:H16	CB5482*****	Erwachsener	D/NRW	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	CB5483*****	Erwachsener	D/NRW	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	CB6175	Kind	D/Bayern	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	CB6236	Erwachsener	unbekannt	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	CB6365*****	Erwachsener	D/NSA	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	CB6366*****	Erwachsener	D/NSA	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	EH78	Kind	Belgien	unbekannt	<i>stx1</i>	+	+	+
	E-D143	Kind	Italien	HUS	<i>stx1</i>	+	+	+
	T17968	Erwachsener	Österreich	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	VTH28	Kind	Spanien	Erbrechen	<i>stx1</i>	+	+	+
	VTH62	Erwachsener	Spanien	Durchfall, Erbrechen	<i>stx1</i>	+	+	+
	EC970130	Kind	Schweiz	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+
	98-08665	Erwachsener	D/Bayern	Durchfall	<i>stx1</i>	+	+	+

**Fortsetzung Tab.12c: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von humanen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=29)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:H16	98-10617-1	Erwachsener	D/Schlesw.-H.	Gastroenteritis	<i>stx1</i>	+	+	+
	98-12039	Erwachsener	D/NRW	unbekannt	<i>stx1</i>	+	+	+
O118:NM	98-08935	Kind	D/Schlesw.-H.	HUS	<i>stx1</i>	+	+	+
O118:H12	CB6069	Erwachsener	D/NRW	Durchfall	<i>stx2</i>	-	-	-
	EH101	Erwachsener	Belgien	Durchfall	<i>stx2</i>	-	-	-
	E25702/0	Erwachsener	UK	Durchfall	<i>stx2</i>	-	-	-
	E29558/0	Erwachsener	UK	blutiger Durchfall	<i>stx2</i>	-	-	-
	E40841/0	Erwachsener	UK	Durchfall	<i>stx2</i>	-	-	-
	E40829/0	Kind	UK	blutiger Durchfall	<i>stx2</i>	-	-	-

**Fortsetzung Tab.12c: Serovare, Shigatoxin-Genotypen, *eae*-Gene und hämolysierende Eigenschaften von humanen *E. coli* Stämmen der Serogruppe O118 (n=29)**

Serovar	Stamm	Isoliert von		Anamnese	<i>stx</i> -Gen	<i>eae</i> -Gen	Hly <sub>EHEC</sub>	<i>espP</i>
		Altersgruppe	Land					
O118:H12	489-36/84 <sup>5</sup>	Kind	Peru	Durchfall	-	-	-	+
	488-36/84 <sup>5</sup>	Kind	Peru	Durchfall	-	-	-	-
	490-36/84 <sup>5</sup>	Kind	Peru	Durchfall	-	-	-	-
	492-36/84 <sup>5</sup>	Kind	Peru	Durchfall	-	-	-	-
O118:H30	E-D27	unbekannt	Kanada	HUS	<i>stx2</i>	+	-	-
	E355	unbekannt	Kanada	Durchfall	<i>stx2</i>	+	-	-
	EC930540	Erwachsener	Kanada	Durchfall	<i>stx2</i>	+	-	-

#### 4.2. Untersuchungen zur klonalen Verwandtschaft von *E.coli*-Stämmen der Serovar O118

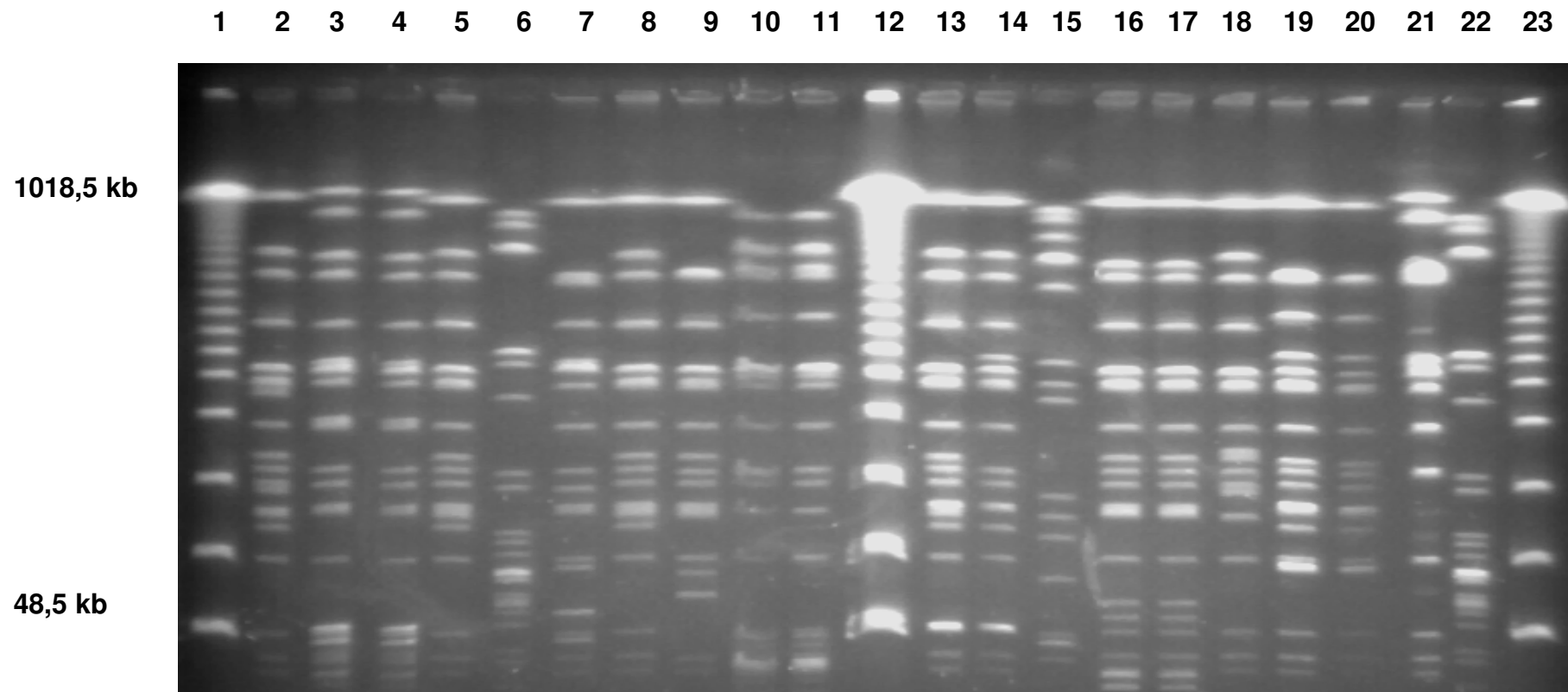
Die bisher erzielten Ergebnisse lassen auf eine nahe Verwandtschaft der untersuchten O118-Stämme verschiedener Spezies schließen. Diese Vermutung sollte durch eine Analyse der Klonalität dieser Isolate bestätigt werden.

Zu diesem Zweck wurde die Methode der Makrorestriktion angewandt:

Die DNS der 100 STEC-Stämme wurde mit den beiden Restriktionsendonukleasen *BlnI* und *XbaI* über einen Zeitraum von vier Stunden verdaut und anschließend mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PAGE) der Größe nach aufgetrennt. Die Zahl der nach *BlnI*-Verdau erhaltenen DNS-Fragmente betrug zwischen 12 und 15, die nach *XbaI*-Verdau 15 bis 21.

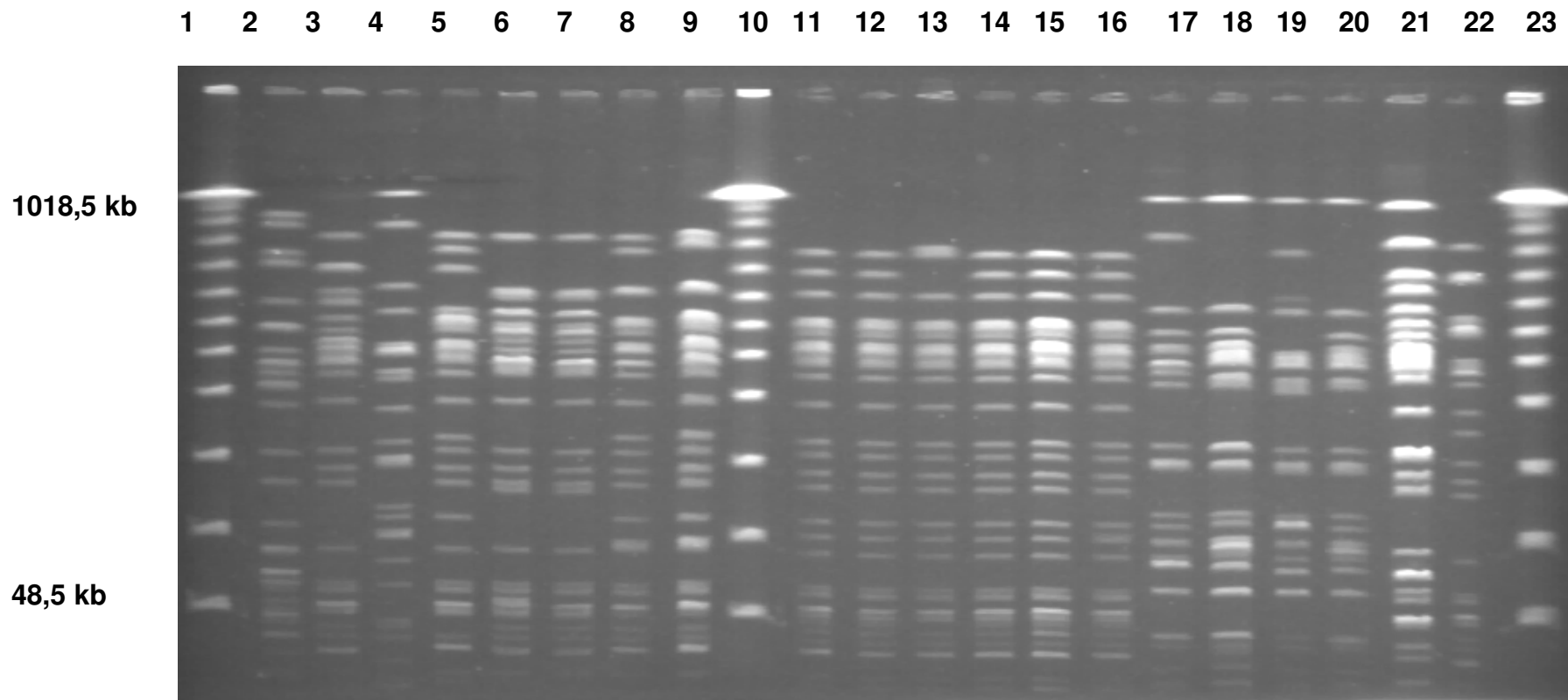
**Abb. 8** und **9** zeigen beispielhaft zwei Elektropherogramme nach Makrorestriktion mit den Restriktionsendonukleasen *BlnI* und *XbaI*. Es wurden jeweils 20 verschiedene Stämme sowie drei Konkamere eines Lambda-Phagen aufgetragen. Auf jedem Gel wurde als Referenzstamm der O157:H7 (EDL 933) Stamm mitlaufen gelassen.

Die entstandenen Bandenmuster wurden unter Verwendung des Jaccard-Koeffizienten (UPGMA) mit dem Computerprogramm Gel Compar<sup>®</sup> der Firma Applied Maths (Kortrijk, Belgien) ausgewertet. In den so erstellten Dendrogrammen sind neben den untersuchten Stämmen jeweils als Referenzstämme ein O157:H7 (EDL 933), ein O26:H11 (H19) und ein O26:H- (413/89-1) enthalten.



**Abb. 8: Elektropherogramm nach Makrorestriktion mit *BlnI* (20 Stämme)**

Spur (1), (12) und (23): Lambda-Ladder; (2) RW 2311; (3) RW 2266; (4) RW 2125; (5) RW 1365; (6) 340; (7) RW 0136, (8) RW 2136; (9) RW 2030; (10) RW 2199; (11) RW 1299; (13) CB 5482; (14) CB 5483; (15) CB 6069; (16) CB 6175; (17) D1154/10; (18) CB 6236; (19) CB 6365; (20) CB 6366; (21) 413/89-1; (22) EDL 933



**Abb. 9: Elektropherogramm nach Makrorestriktion mit *Xba*I (20 Stämme)**

Spur (1), (10) und (23): Lambda-Ladder; (2) 2198-77; (3) 367S89; (4) CB6069; (5) CB6236; (6) CB6365; (7) CB6366, (8) CB6175; (9) D1154/10; (11) GS1161-1; (12) GS1180-1; (13) GS1181-1; (14) GS1205-1; (15) GS1232-1; (16) GS1236-1; (17) 488-36/84; (18) 489-36/84; (19) 490-36/84; (20) 492-36/84; (21) 413/89-1; (22) EDL 933

#### 4.2.1. Klonale Analyse der *E.coli*-O118-Stämme vom Tier

Nach Makrorestriktion aller *E.coli*-O118-Stämme vom Tier mit der Endonuklease *BlnI* entstand ein Dendrogramm (**Abb. 10**), das in drei weitere Gruppen, die im folgenden als **Cluster A<sub>T(ier)</sub>**, **B<sub>T</sub>**, **C<sub>T</sub>** bezeichnet werden, unterteilt werden konnte:

**Cluster A<sub>T</sub>** stellte mit 66 Stämmen die größte Gruppe dar und enthielt mit Ausnahme des Ziegenisolates und des O26:H11 Referenzstammes H19 (Mensch) ausschließlich Stämme vom Rind. 54 der 66 Isolate gehörten zur Serovar O118:H16, 10 Stämme waren O118:NM und zwei Isolate (Referenzstämme) gehörten zur Serogruppe O26. Innerhalb dieser Gruppe waren die Isolate weitestgehend gemäß ihrer geographischen Herkunft angeordnet. So bildeten die Isolate aus Hessen, Bayern, Belgien, der Schweiz und Kanada eigene kleine Untergruppen, in denen in 39 Fällen eine 100 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters nachgewiesen werden konnte. Hervorzuheben ist der Stamm VTF 205 aus Spanien, der mit sechs hessischen Isolaten identisch war.

**Cluster B<sub>T</sub>** setzte sich zusammen aus vier O118:H9:K- Stämmen aus Kanada, die von Schweinen isoliert worden waren, sowie dem O118:H- Referenzstamm 31W/Orskov aus Schweden. In diesem Cluster konnte keine 100 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters gefunden werden, jedoch zeigten die vier porcinen Isolate Übereinstimmungen zwischen 47 % und 87 %.

Das dritte **Cluster C<sub>T</sub>** wurde von drei Stämmen gebildet: einem kanadischen Isolat vom Schwein, einem belgischen Stamm vom Kalb und dem amerikanischen O157:H7 Referenzstamm EDL 933 vom Menschen. Die beiden letzteren wiesen eine 100 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters auf.

Die Makrorestriktion mit der Endonuklease *XbaI* zeigte eine ähnliche endemische Verteilung der untersuchten Isolate vom Tier (**Abb. 11**). Hier konnten drei **Cluster D<sub>T</sub>**, **E<sub>T</sub>**, **F<sub>T</sub>** unterschieden werden.

**Cluster D<sub>T</sub>** umfaßte 65 STEC-Stämme vom Rind, einen Stamm von einer Ziege sowie den Referenzstamm EDL 933 vom Menschen. Wie nach dem Verdau mit *BlnI* konnten auch hier die untersuchten Stämme gemäß ihrer geographischen Herkunft in weitere Untergruppen eingeteilt werden. 29 Isolate zeigten eine 100 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters. Darunter befand sich neben dem spanischen Stamm VTF 205 auch der aus demselben Land isolierte Stamm VTB 113, die beide mit hessischen Isolaten identisch waren.

**Cluster E<sub>T</sub>** wurde von den vier porcinen O118:H9:K- Stämmen aus Kanada gebildet, von denen zwei Isolate eine 100 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters aufwiesen.

Zum **Cluster F<sub>T</sub>** wurden der O118:H- Stamm 31W/Orskov aus Schweden (Kalb) sowie der O118:NM Stamm P86-82C aus Kanada (Schwein) zusammengefaßt, die über eine Ähnlichkeit von 62 % verfügten. Der O118:H16 Stamm 340, der nach *BlnI*-Verdau zum Cluster C gezählt wurde, wich in seiner klonalen Verwandtschaft deutlich von den übrigen untersuchten Isolaten ab und wurde deshalb keinem Cluster zugeordnet.



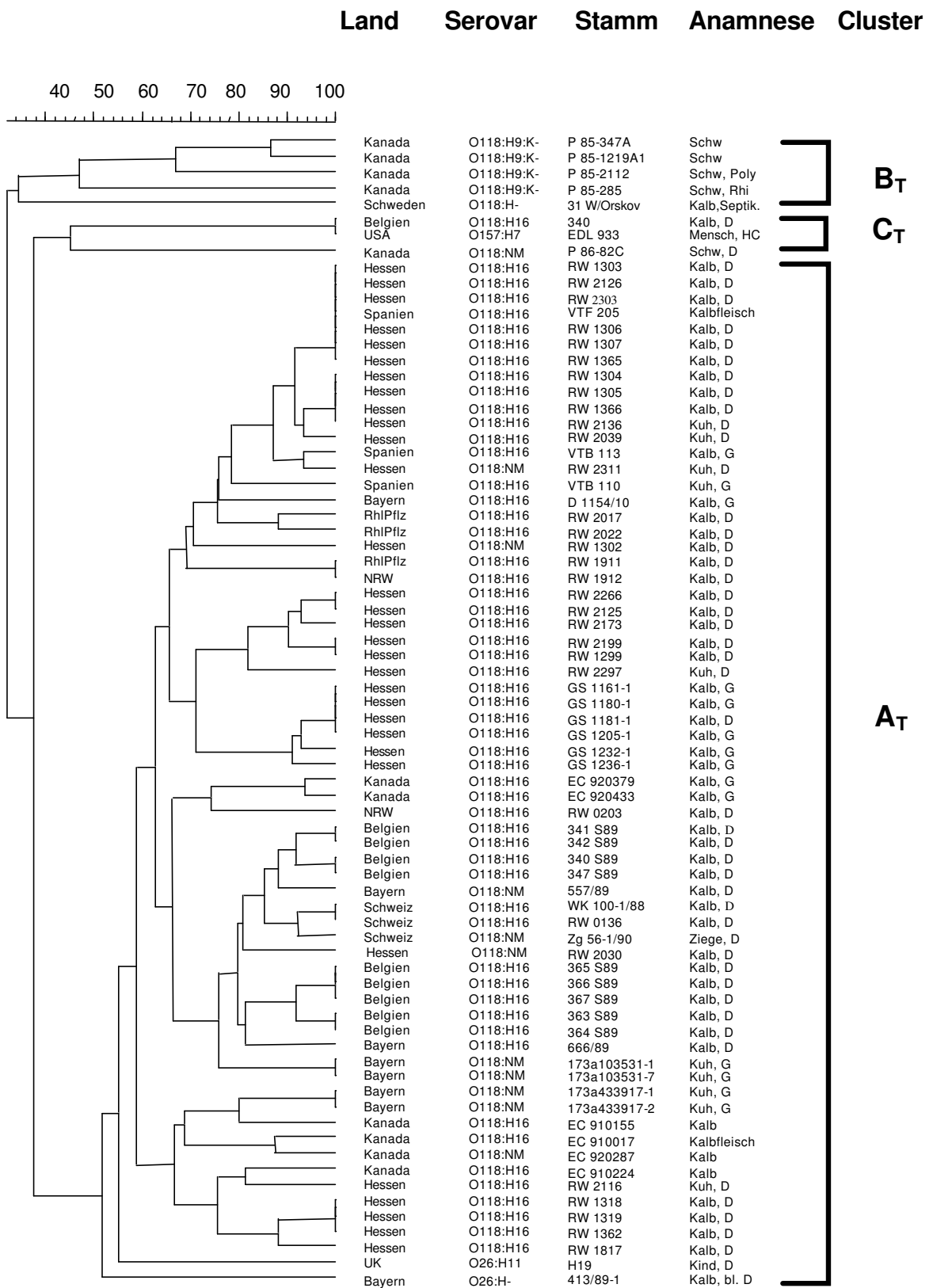


Abb. 10: Dendrogramm nach Makrorestriktion mit *BlnI* (alle O118-Stämme vom Tier)

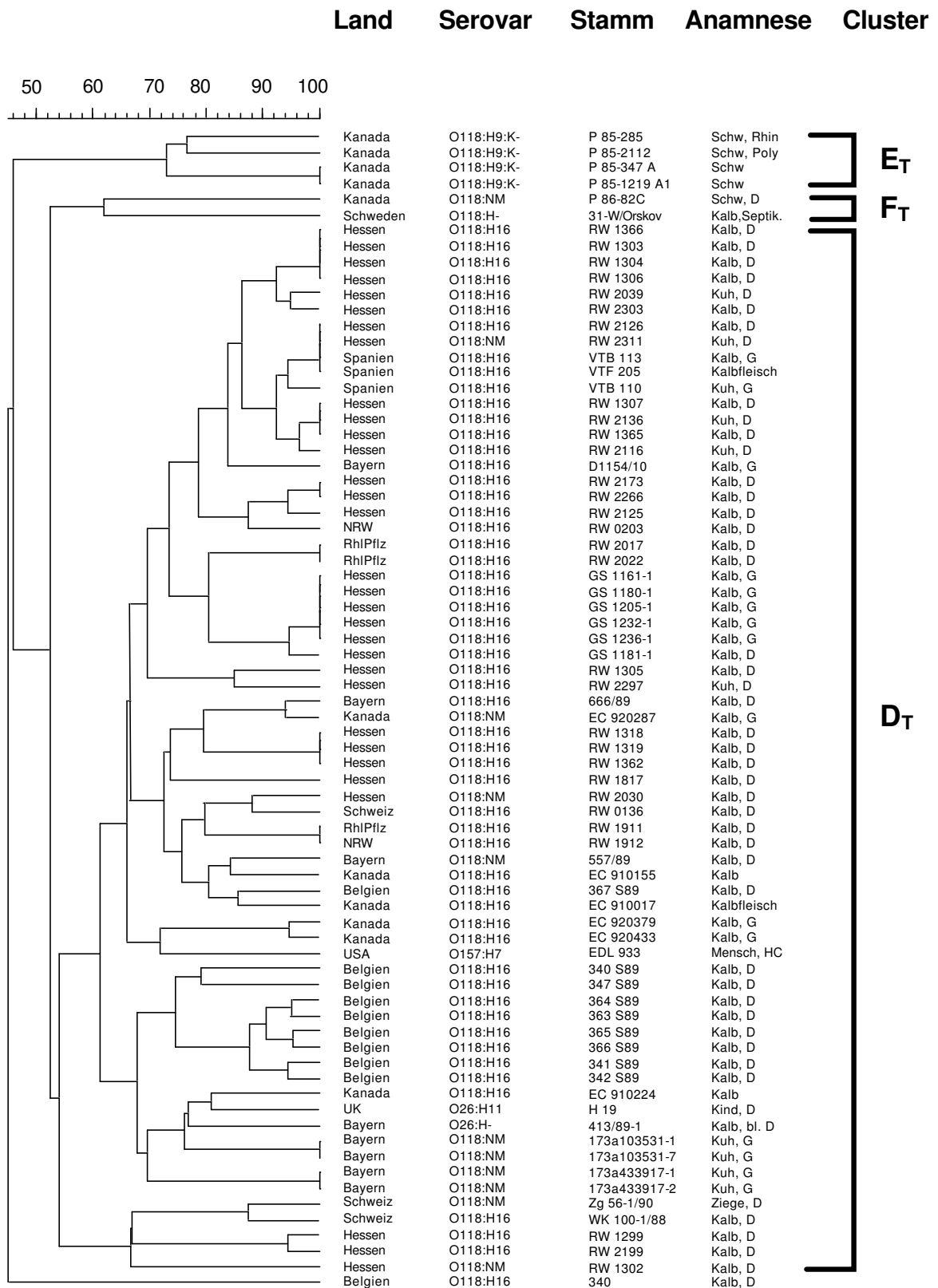


Abb. 11: Dendrogramm nach Makrorestriktion mit XbaI (alle O118-Stämme vom Tier)

#### 4.2.2. Klonale Analyse der *E.coli*-O118-Stämme vom Menschen

Betrachtete man die klonale Verwandtschaft der *E.coli*-O118-Isolate vom Menschen, so konnte nach Makrorestriktion mit *BlnI* ein Dendrogramm (**Abb. 12**) erstellt werden, das aus den drei **Clustern**  $A_{M(\text{ensch})}$ ,  $B_M$ ,  $C_M$  bestand:

**Cluster**  $A_M$  umfaßte 18 Stämme, darunter 11 Isolate aus Deutschland (10 vom Menschen und ein Referenzstamm vom Kalb), zwei Stämme aus Spanien sowie jeweils ein Isolat aus Belgien, Österreich, Italien, England und der Schweiz. 15 der 18 Isolate gehörten zur Serovar O118:H16, ein Stamm zur Serovar O118:NM und zwei Isolate zur Serogruppe O26. Die Stämme CB 6366 aus Niedersachsen sowie VTH 62 aus Spanien zeigten eine 100 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters. Die übrigen Stämme dieses Clusters variierten in ihrem Verwandtschaftsgrad zwischen 52 % und 92 %.

**Cluster**  $B_M$  wurde ausschließlich von Stämmen der Serovar O118:H12 gebildet. Darunter befanden sich vier ETEC Stämme aus Peru, vier Isolate aus England und jeweils ein Stamm aus Deutschland und Belgien. Die Isolate aus Peru gehörten wie auch die englischen Isolate einer eigenen Untergruppe an.

Das **Cluster**  $C_M$  setzte sich aus drei kanadischen O118:H30 Isolaten sowie dem O157:H7 Referenzstamm EDL 933 zusammen, die keine 100 %igen Verwandtschaften aufwiesen, jedoch eine engere Verwandtschaft der O118:H30 Isolate zueinander zeigten.

Das nach Verdau mit der Endonuklease *XbaI* erstellte Dendrogramm ergab ein ähnliches Ergebnis (**Abb. 13**):

Das **Cluster**  $D_M$  wurde von denselben Isolaten gebildet wie Cluster A nach *BlnI* Verdau. Zusätzlich wurde in diese Gruppe der Referenzstamm EDL 933 eingeordnet. Die Stämme CB 6365 und CB 6366 waren zu 100 % identisch.

**Cluster E<sub>M</sub>** umfaßte ebenfalls die bereits nach *Bnl* Verdau genannten O118:H12 Isolate aus England, Peru, Deutschland und Belgien. Hier war die Bildung der Untergruppen jedoch nicht so stark ausgeprägt wie nach *Bnl*-Verdau. Zwei der vier peruanischen Stämme (489-36/84 und 492-36/84) waren zu 100 % identisch.

**Cluster F<sub>M</sub>** setzte sich aus drei kanadischen O118:H30 Isolaten zusammen. Diese zeigten Verwandtschaftsgrade zwischen 61 % und 88 %.

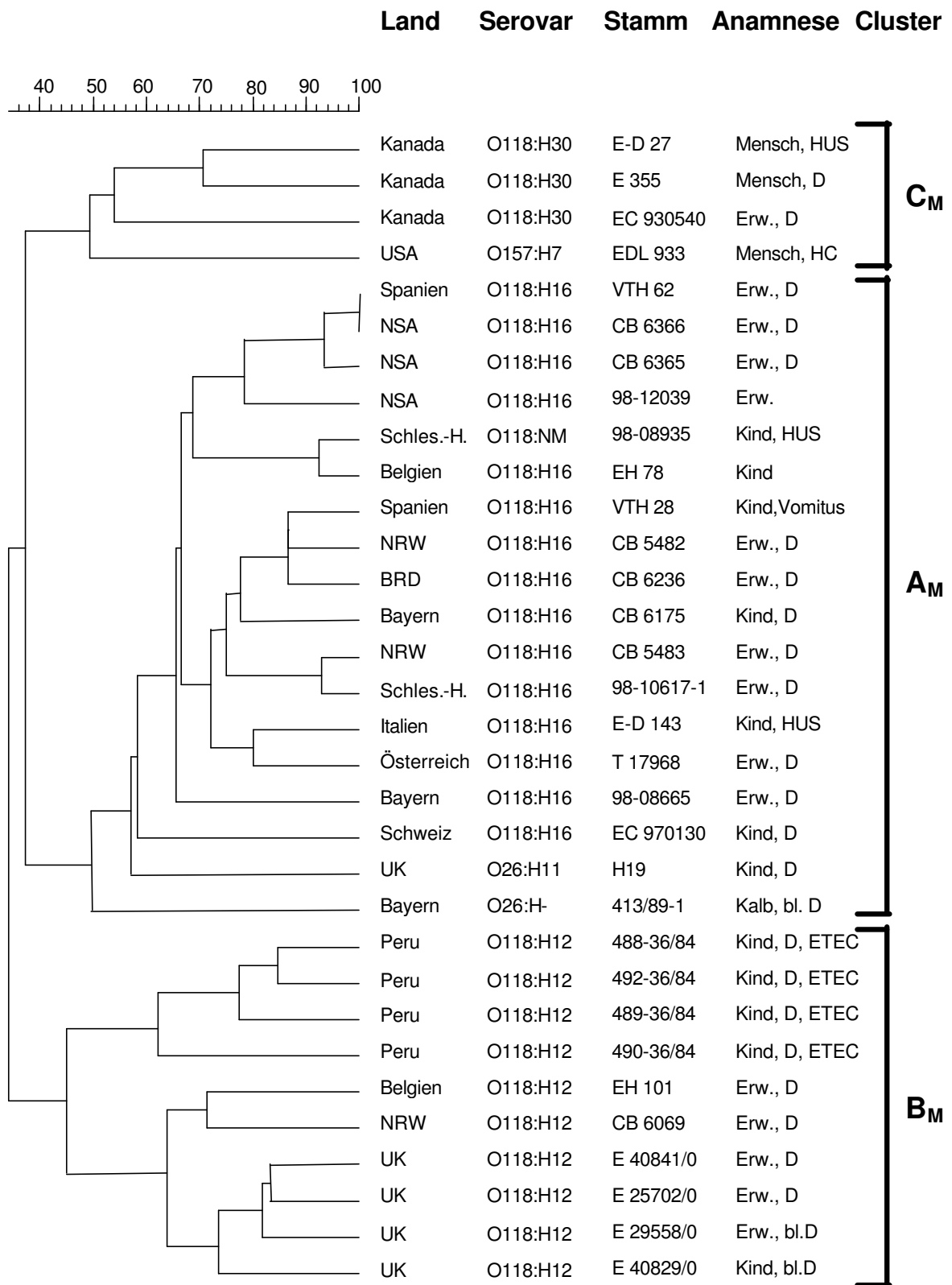
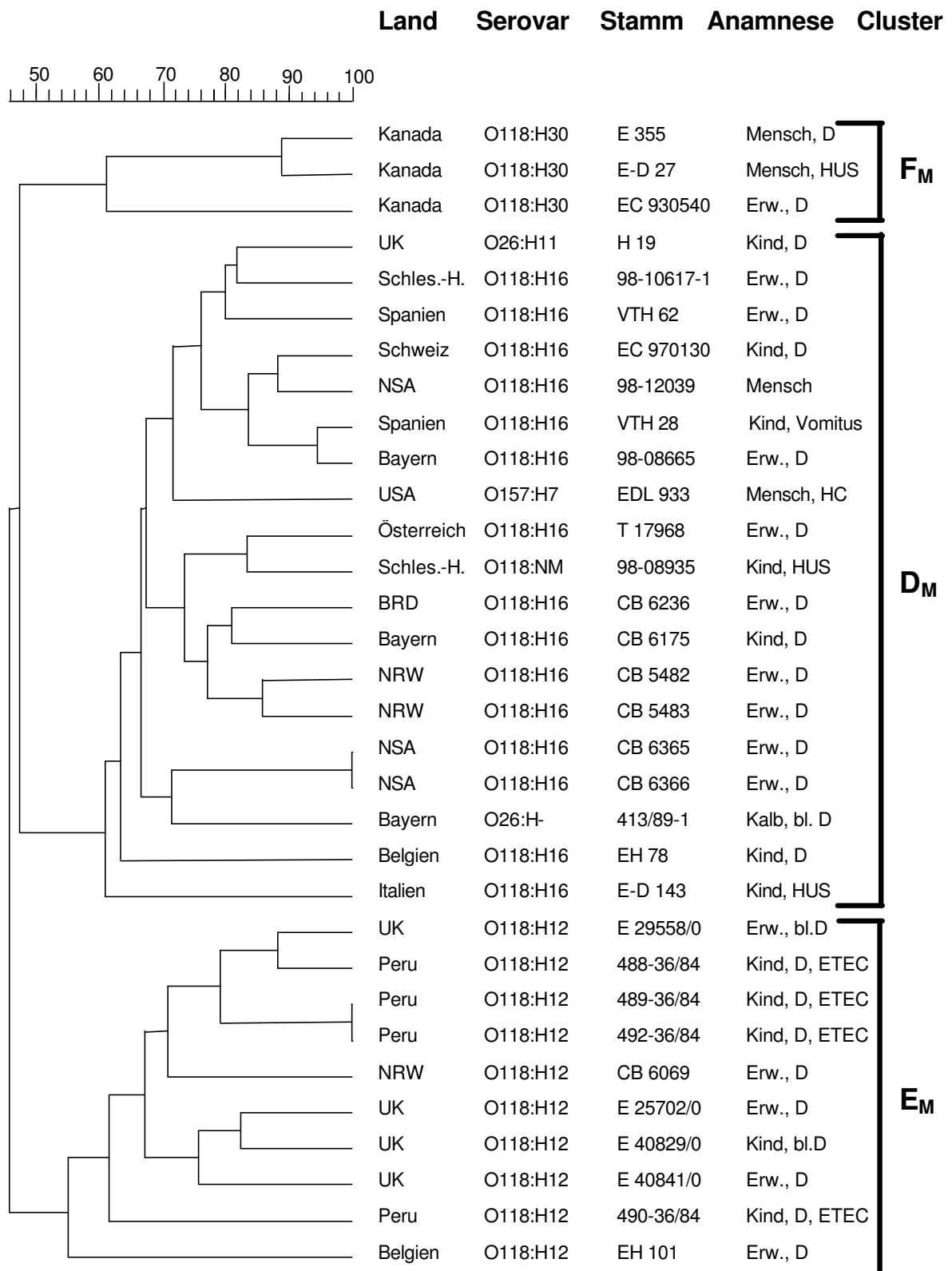


Abb. 12: Dendrogramm nach Makrorestriktion mit *BlnI* (alle O118-Stämme vom Menschen)



**Abb. 13: Dendrogramm nach Makrorestriktion mit *Xba*I (alle O118-Stämme vom Menschen)**

#### 4.2.3. Vergleichende klonale Analyse der *E.coli*-O118-Stämme von Mensch und Rind

Da die Untersuchungen auf das Vorkommen der typischen EHEC-Virulenzeigenschaften (*stx1*, *stx2*, *eae* und  $Hly_{EHEC}$ ) der *E.coli*-O118-Isolate von Mensch und Rind eine große Ähnlichkeit zwischen diesen Stämmen erbrachte, sollte eine vergleichende klonale Analyse Aufschluß über den Verwandtschaftsgrad der Isolate menschlicher und tierischer Herkunft geben. Um die Zahl der analysierten Stämme einzugrenzen, wurde jeweils ein Stamm aus jedem der hier untersuchten Länder (in der BRD Bundesländer) und der unterschiedlichen Serovare in die Berechnung der folgenden Dendrogramme (**Abb. 14** und **15**) einbezogen. Dabei wurden die Stämme (17 Isolate vom Menschen, 13 Stämme vom Rind und drei Referenzstämme) willkürlich ausgewählt.

Nach Makrorestriktion mit der Endonuklease *BlnI* entstand ein Dendrogramm (**Abb. 14**), das in zwei weitere Gruppen, **Cluster A<sub>M(ensch)+R(ind)</sub>** und **Cluster B<sub>M+R</sub>**, unterteilt werden konnte:

In **Cluster A<sub>M+R</sub>** waren 23 O118-Stämme enthalten, die unterschiedliche Verwandtschaftsgrade aufwiesen. Darunter befanden sich 12/13 Stämme vom Rind sowie 11/17 vom Menschen. Die Mehrzahl der Stämme (17/23) gehörte der Serovar O118:H16 an. Vier Isolate waren O118:NM, und bei zwei Stämmen handelte es sich um die beiden O26-Referenzstämme. Bei sechs Stämmen konnte eine 100 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters gefunden werden; darunter stammten drei Isolate vom Menschen. Eines der drei Isolate (Stamm CB6175) war zu 100 % identisch mit einem Stamm (Isolat D1154/10) boviner Herkunft, während es sich bei den übrigen 100 % identischen Isolaten jeweils um zwei bovine bzw. zwei humane Stämme handelte. Die übrigen Isolate variierten in ihrem Verwandtschaftsgrad zwischen 50 % und 92 %. Auffällig war, daß die Humanisolate gleichmäßig zwischen den Stämmen boviner Herkunft verteilt waren.

**Cluster B<sub>M+R</sub>** wurde gebildet von vier O118:H12 Stämmen, die eine eigene Untergruppe darstellten, sowie einem O118:H30 Isolat und dem Referenzstamm EDL 933 (O157:H7). Alle Isolate stammten vom Menschen. Auch einer der ETEC Stämme von einem durchfallkranken Kind aus Peru konnte in diese Gruppe eingeordnet werden. Die klonale Verwandtschaft der Stämme variierte zwischen 40 % und 72 %.

Der O118:H- Stamm 31W/Orskov eines septikämischen Kalbes aus Schweden, der sich sowohl in seinen Virulenzeigenschaften (s.o.) als auch in seiner klonalen Verwandtschaft deutlich von allen anderen untersuchten Isolaten unterschied, konnte keinem der beiden Cluster zugeordnet werden.

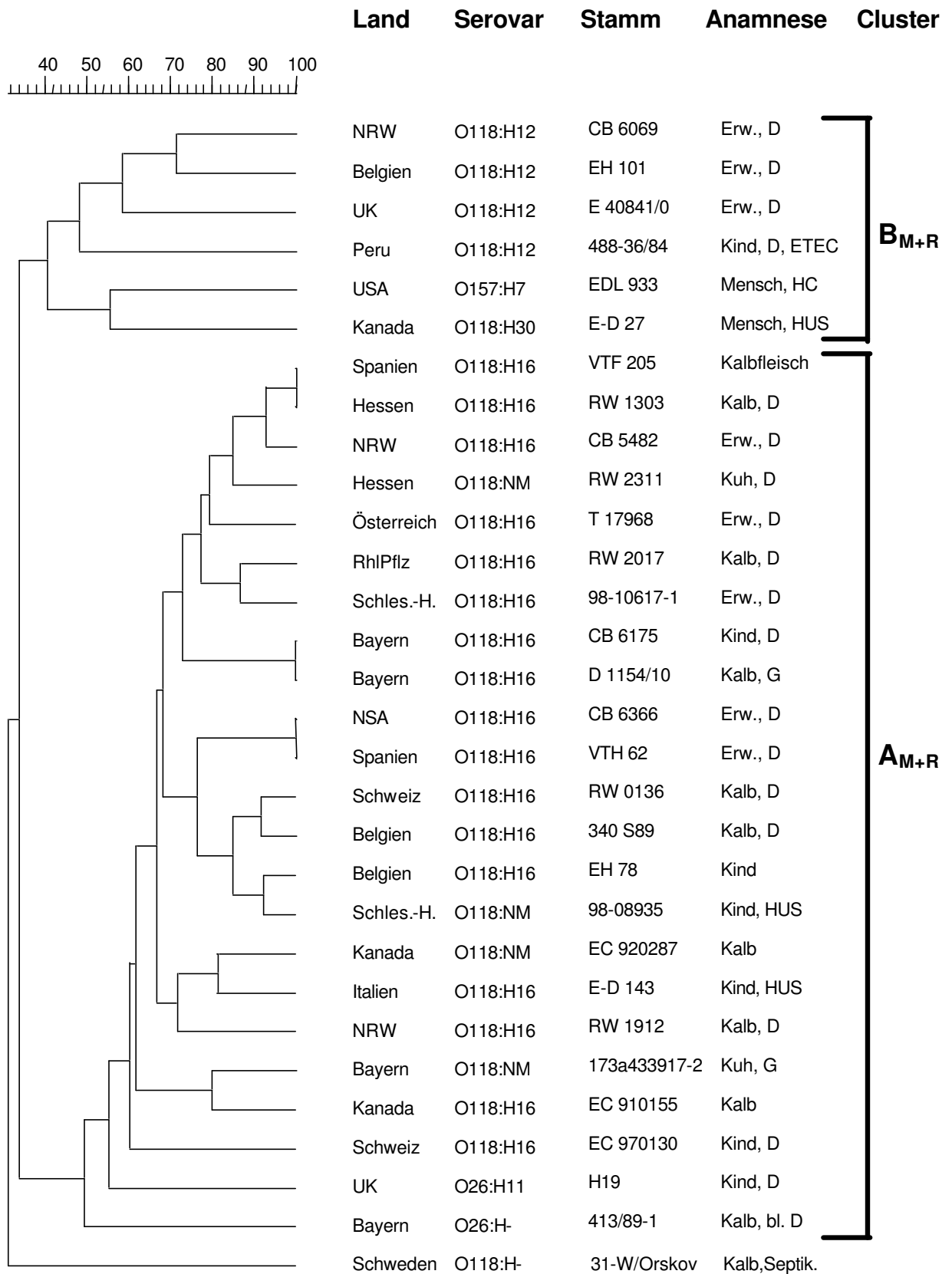
Die Makrorestriktion mit der Endonuklease *Xba*I erbrachte ein ähnliches Ergebnis, das zur Erstellung des Dendrogramms in der **Abb. 15** führte. Wie nach dem Verdau mit *Bln*I konnten auch hier zwei **Cluster C<sub>M+R</sub>** und **D<sub>M+R</sub>** unterschieden werden:

**Cluster C<sub>M+R</sub>** setzte sich zusammen aus 24 O118 Isolaten, von denen die meisten (17/24) dem Serovar O118:H16 zuzuordnen waren. Vier Stämme gehörten der Serovar O118:NM an. Zusätzlich waren in diesem Cluster die drei Referenzstämme EDL 933 (O157:H7), 413/89-1 (O26:H-) und H19 (O26:H11) vertreten. In Cluster A befanden sich mit einer Ausnahme (31W/Orskov) alle Isolate vom Rind (12/13) sowie 12 Stämme vom Menschen. Vier Stämme dieses Clusters (drei vom Rind und einer vom Menschen) zeigten eine 100 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters. Der Rinderstamm VTF205 aus Spanien, der nach *Bln*I-Verdau zunächst mit Stamm RW1303 (Hessen) identisch war, zeigte nach Restriktion mit *Xba*I ein 100 % identisches Bandenmuster mit einem anderen hessischen Isolat vom Rind (RW2311). Stamm CB6175 war dagegen auch nach *Xba*I-Verdau mit dem bayrischen Isolat D1154/10 identisch. Diese beiden Stämme hatten bereits nach Verdau mit *Bln*I das gleiche Ergebnis gezeigt. Es handelte sich bei diesen beiden Isolaten um Stämme aus einer kürzlich veröffentlichten (105) EHEC-Infektion eines Kindes, das Kontakt zu einem gesunden Kalb hatte. Die bei beiden gefundenen O118:H16 Isolate waren die einzigen in dieser Arbeit verwendeten Stämme, deren Herkunft auf eine mögliche Kontaktinfektion hinwies.

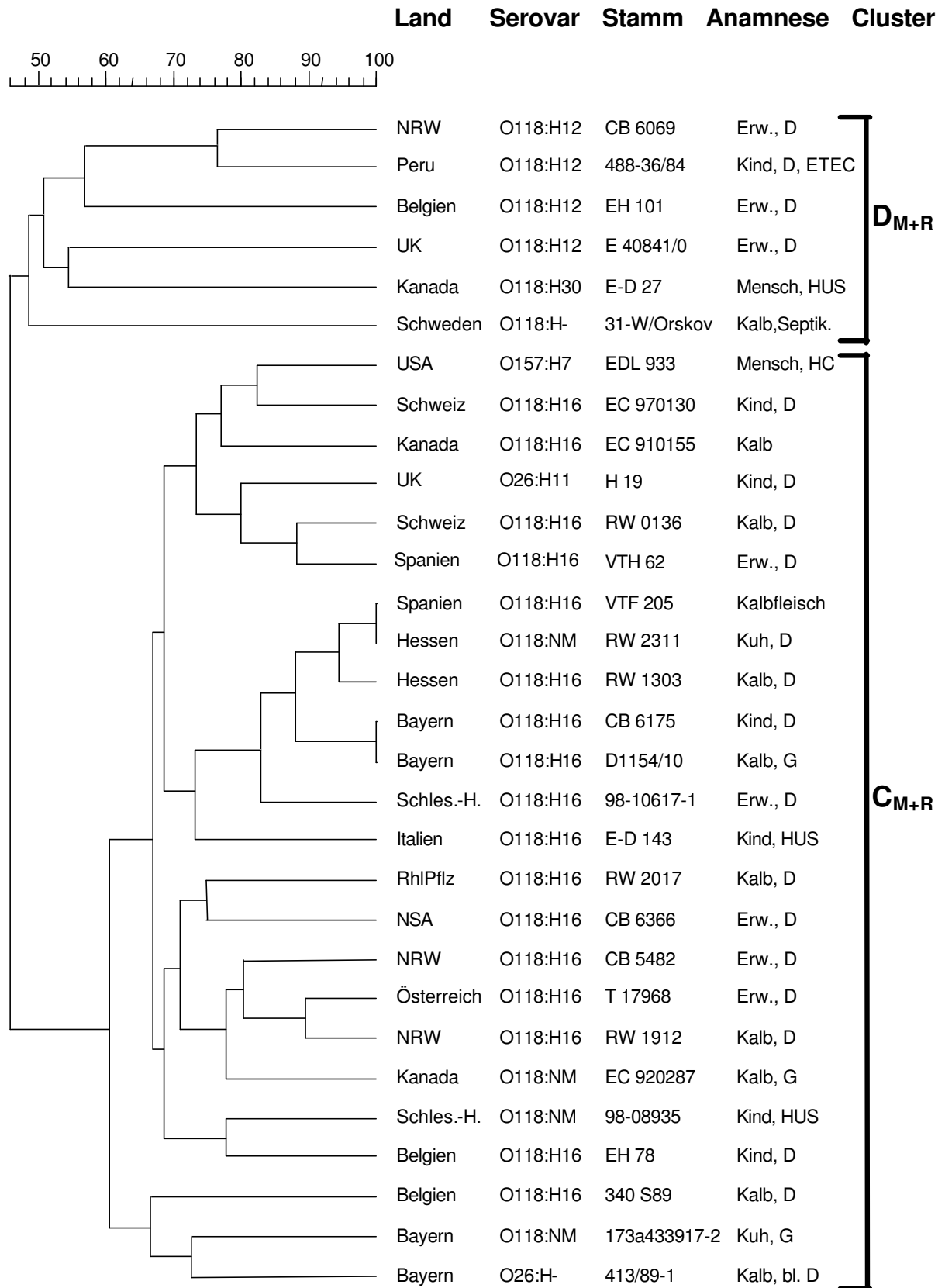


**Cluster D<sub>M+R</sub>** war in der Zusammensetzung seiner Stämme identisch mit dem Cluster B<sub>M+R</sub>, das nach Restriktion mit *BlnI* definiert werden konnte. Es handelte sich auch hier um vier O118:H12 Isolate (darunter der ETEC Stamm aus Peru) sowie den O118:H30 Stamm aus Belgien. Anstelle des O157:H7 Referenzstammes EDL 933 fand sich in diesem Cluster der O118:H- Stamm 31-W/Orskov. Die Verwandtschaftsgrade variierten zwischen 48 % und 76 %.

Da die beiden bayrischen Isolate CB6175 vom Menschen und D1154/10 vom Rind die einzigen Stämme waren, die nach Makrorestriktion mit beiden verwendeten Enzymen eine 100 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters zeigten, und es sich zudem um zwei veröffentlichte Isolate (105) einer tatsächlich stattgefundenen EHEC-Infektion handelte, sollten im folgenden alle Humanisolate mit den Rinderstämmen aus Bayern verglichen werden.



**Abb. 14: Dendrogramm der vergleichenden klonalen Analyse ausgewählter O118-Stämme von Mensch und Rind nach Makrorestriktion mit *BlnI***



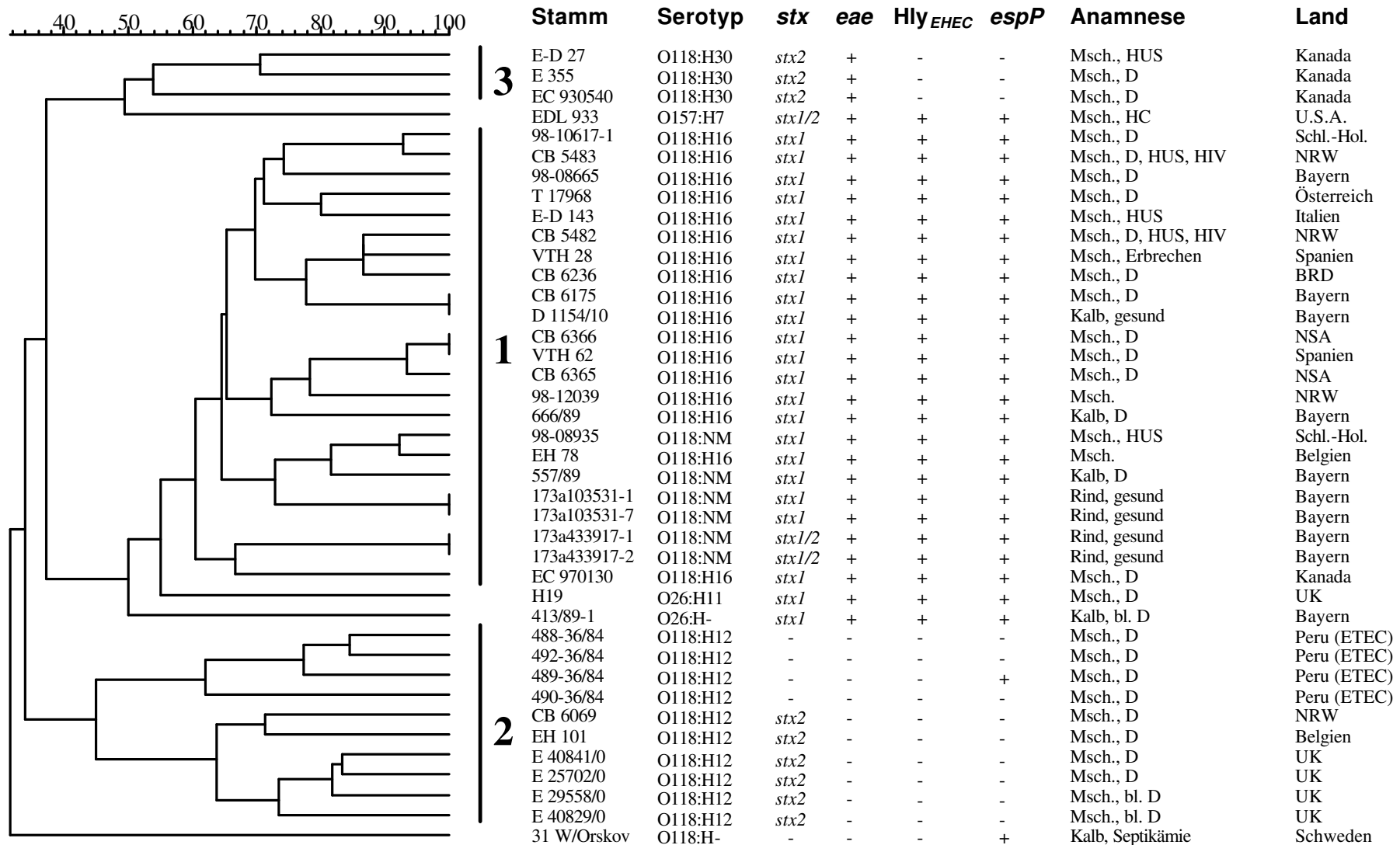
**Abb. 15: Dendrogramm der vergleichenden klonalen Analyse ausgewählter O118-Stämme von Mensch und Rind nach Makrorestriktion mit *Xba*I**

#### 4.2.4. Klonale Analyse der *E.coli*-O118-Stämme vom Rind (Bayern) und vom Menschen

Der bereits erwähnte kürzlich veröffentlichte Bericht von Weber et al. (105) über ein Kind in Bayern, bei dem eine EHEC-Infektion mit einem O118:H16 Stamm festgestellt wurde und das nachweislich Kontakt zu einem gesunden Kalb hatte, veranlaßte uns, die Stämme humaner Herkunft hinsichtlich ihrer klonalen Verwandtschaft mit denen boviner Herkunft aus Bayern zu untersuchen. Die 29 Isolate von Humanpatienten wurden mit insgesamt sieben Isolaten vom Rind verglichen.

Nach Makrorestriktion mit *BlnI* konnten die Stämme in drei Gruppen (**Abb. 16**) unterteilt werden, denen jeweils bestimmte H-Antigene zugeordnet werden konnten. Die meisten Stämme (23) gehörten zur Serovar O118:H16 und verfügten über die EHEC-typischen Virulenzmerkmale *stx1*, *eae*,  $Hly_{EHEC}$  und EspP (**Gruppe 1**). In dieser Gruppe befanden sich auch sieben der acht Isolate vom Rind, von denen zwei zusätzlich positiv für *stx2* waren. Dagegen wurden in **Gruppe 2** zehn Stämme humaner Herkunft (vier davon waren ETEC) der Serovar O118:H12 gefunden, die mit Ausnahme der ETEC lediglich das *stx2* besaßen. **Gruppe 3** setzte sich aus drei Stämmen vom Menschen zusammen, die der Serovar O118:H30 angehörten und neben dem *stx2* über das *eae*-Gen verfügten.

Mit Ausnahme eines Stammes (31-W/Orskov) konnten alle O118:NM Isolate der Gruppe 1 zugeordnet werden. Da diese Isolate die gleichen Virulenzmerkmale wie die Stämme der Serovar O118:H16 besaßen und sich nur in ihrer Mobilitätsfähigkeit von diesen unterschieden, untersuchten wir sie auf das Vorhandensein des Strukturgens für das Geißelschaftprotein *fliC*.

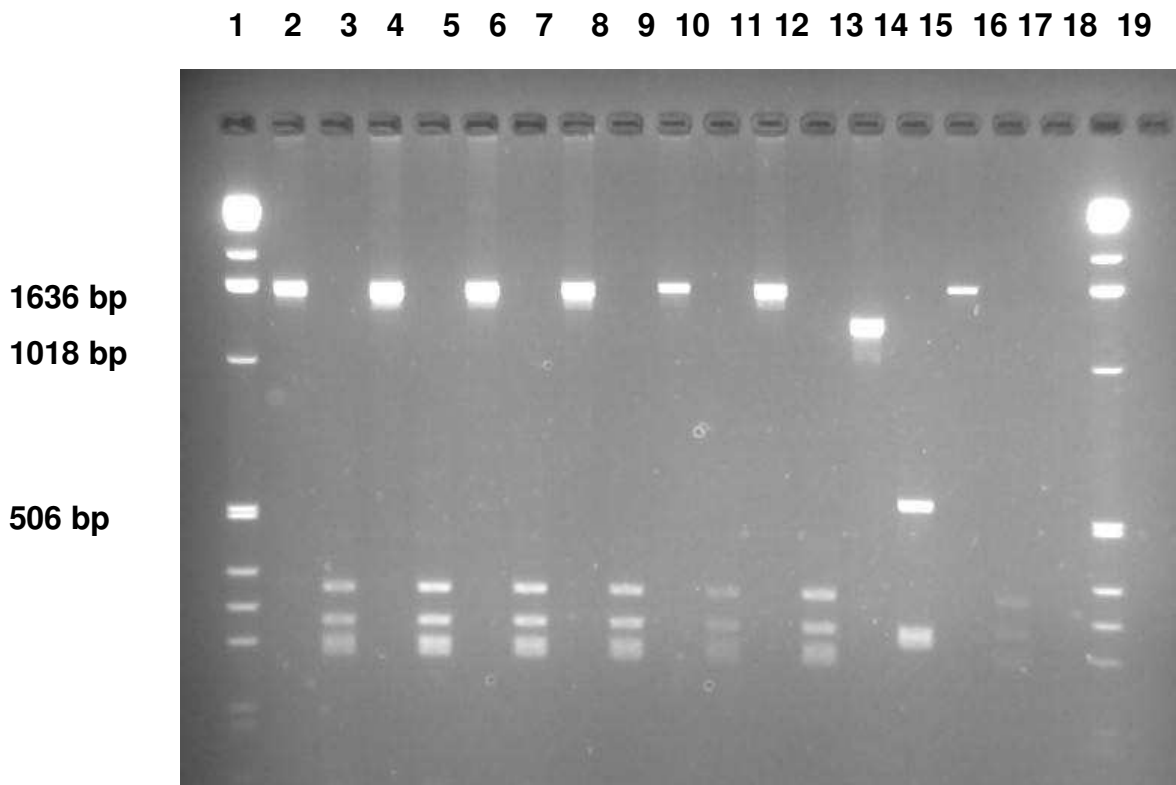


**Abb. 16: Dendrogramm zur klonalen Verwandtschaft boviner und humaner *E.coli*-O118 Isolate nach Makrorestriktion mit *BlnI***

#### 4.2.5. Nachweis des Strukturgens für das Geißelschaftprotein *fliC*

Einer Veröffentlichung von Fields et al. folgend (32), konnten nach erfolgter *fliC*-PCR und anschließender Restriktion der PCR-Amplifikate mit der Endonuklease *RsaI* bei allen O118:NM Stämmen Banden sichtbar gemacht werden (**Abb. 17a** und **b**), die in ihrer Größe mit denen der O118:H16 übereinstimmten, sich aber deutlich von denen der Serovare O118:H12, O118:H30, O157:H7 und O26:H- unterschieden. Die einzige Ausnahme bildete der O118:H- Stamm 31-W/Orskov, der auch in seinen Virulenzmerkmalen keiner der drei o.g. Gruppen zugeordnet werden konnte.

Da die O118:H16 und sechs der sieben O118:NM Stämme über dieselben Virulenzmerkmale und das gleiche Bandenmuster verfügten und alle Vertreter der Gruppe 1 waren, stellte sich die Frage, ob die unbeweglichen O118:NM Isolate nicht über eine unvollständig ausgebildete Geißel verfügten, die der Geißel der O118:H16 ähnelte. Die daraufhin durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Stämme ergab, daß sowohl die O118:H16 Isolate als auch die O118:NM Stämme über Geißeln verfügten, die im Gegensatz zu denen der O118:H30 und O118:H12 Stämme deutlich kürzer waren. Wir bezeichneten diese Geißeln als Stummelgeißeln. Die Beweglichkeitsprüfung im Hitchens Agar zeigte, daß die Stämme der Serovar O118:H30 vollständig in den Agar diffundierten, die Isolate der Serovar O118:H16 jedoch nur teilweise und die der Serovar O118:NM gar nicht diffundierten. Die Beobachtung, daß sich die Vertreter der Serovar O118:H16 zumindest eingeschränkt bewegen können (**Abb. 18**), die O118:NM Stämme jedoch nicht, muß auf umfangreichere Mutationen im gesamten Geißelapparat der Bakterien zurückgeführt werden. Weitergehende Untersuchungen bezüglich dieser Mutationen wurden von uns jedoch nicht durchgeführt.

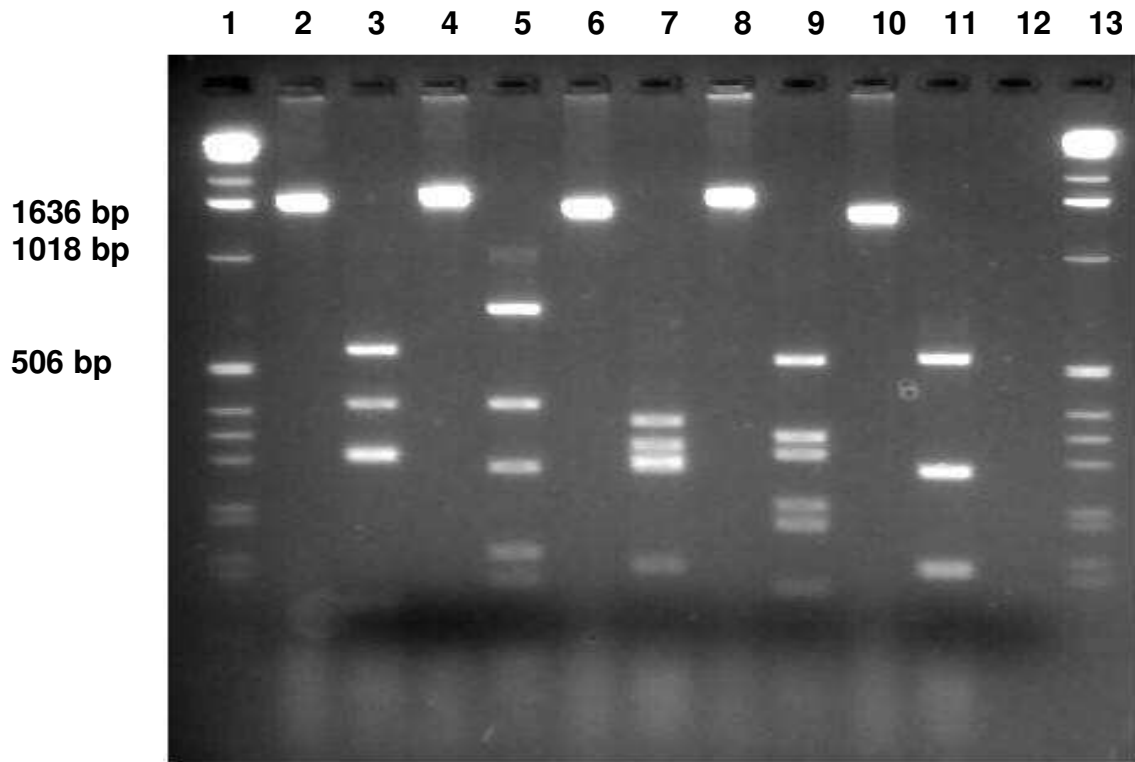


**Abb. 17a: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *fliC*-Gens bei *E.coli*-O118-Isolaten vor und nach Restriktion mit *RsaI* (1,5 %iges Agarosegel, 100V)**

gerade Zahlen: ungeschnittenes PCR-Amplifikat

ungerade Zahlen: mit *RsaI* geschnittenes PCR-Amplifikat

Spur (1) und (19) 1kb-Ladder; (2, 3) 98-08935 (O118:NM); (4, 5) 557/89 (O118:NM); (6, 7) 173a103531-1 (O118:NM); (8, 9) 173a103531-7 (O118:NM); (10, 11) 173a433917-1 (O118:NM); (12, 13) 173a433917-2 (O118:NM); (14, 15) 31W/Orskov (O118:H-); (16, 17) CB 6175 (O118:H16); (18) Aqua bidest



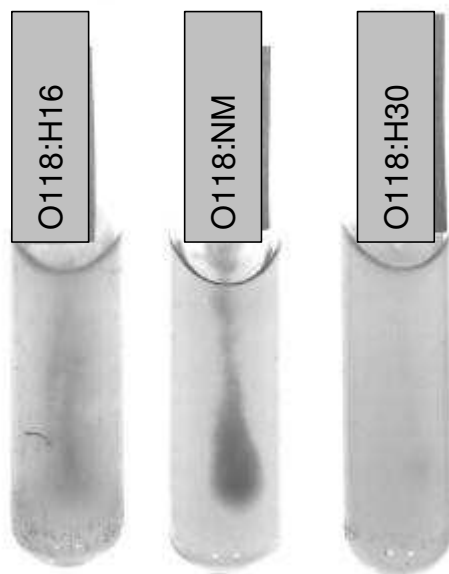
**Abb. 17b: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *fliC*-Gens bei *E.coli*-O118-Isolaten vor und nach Restriktion mit *RsaI* (1,5 %iges Agarosegel, 100V)**

gerade Zahlen: ungeschnittenes PCR-Amplifikat

ungerade Zahlen: mit *RsaI* geschnittenes PCR-Amplifikat

Spur (1) und (13) 1kb-Ladder; (2, 3) E-D27 (O118:H30); (4, 5) CB 6069 (O118:H12); (6, 7) RW 1911 (O118:H16); (8, 9) EDL 933 (O157:H7); (10, 11) 413/89-1 (O26:H-); (12) Aqua bidest





**Abb. 18: Beweglichkeitsprüfung dreier O118-Stämme im Hitchens-Agar**

O118:H16: CB6175, eingeschränkt beweglich

O118:NM: 98-08935, unbeweglich

O118:H30: E-D27, beweglich

## 5. Diskussion

Unter den Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (STEC) haben die Enterohämorrhagischen *E.coli* (EHEC) einen besonderen Stellenwert, da sie beim Menschen verantwortlich sind für die Auslösung des Hämolytisch-Urämischen-Syndroms (HUS) sowie der Hämorrhagischen Kolitis (HC). Diese Krankheiten beruhen auf der Ausprägung der bekannten Virulenzfaktoren: Shigatoxin (*stx*), EHEC-Hämolysin ( $Hly_{EHEC}$ ) und Intimin, dem Produkt des *eae*-Gens (72). Für das Rind dagegen ist bekannt, daß diese Virulenzmerkmale keine der beim Menschen belegte vergleichbare Rolle spielen. Die Serovar O157:H7, die beim Menschen für die meisten Krankheitsausbrüche verantwortlich ist (54, 55), wurde zwar auch beim Rind isoliert, spielt jedoch als Krankheitserreger bei diesen Tieren nur eine untergeordnete Rolle (20, 38). Hingegen weisen neuere Untersuchungen darauf hin, daß STEC der Serogruppe O118 eine ätiologische Bedeutung im Rahmen des Kälberdurchfalls besitzen. So zeigen O118-Stämme unter den bovinen STEC- Isolaten von Kälbern in Deutschland und Belgien die höchste Prävalenz (86, 118), und diese Stämme weisen Virulenzmerkmale auf, die in der Pathogenese des Kälberdurchfalls eine große Rolle spielen (18, 98). Erst kürzlich veröffentlichte Ergebnisse über Infektionsversuche an neugeborenen Kälbern mit einem O118:H16 Stamm zeigten, daß diese Tiere innerhalb von 24 Stunden starken Durchfall entwickelten, der mit den typischen A/E-Läsionen in der Darmschleimhaut einhergeht (98). Untersuchungen zur Subtypisierung des für die A/E-Läsion verantwortlichen *eae*-Gens ergaben, daß dieses bei bovinen und humanen EPEC- und EHEC-Stämmen der Serogruppe O26, O111 und O157 sehr ähnlich ist. So konnten in DNS-Koloniehybridisierungsversuchen von China et al. (18) 73 % der untersuchten EPEC- und EHEC-Stämme kranker Kälber bzw. 82 % gesunder Schlachttiere mit einer aus einem humanen O157:H7-Isolat hergestellten Sonde erkannt werden. Umgekehrt reagierten neun humane EHEC der Serogruppe O26 und sieben der Serogruppe O111 positiv mit einer bovinen O26:H- Sonde.

Das heißt, für die Serogruppen O26 und O111 konnten bei Mensch und Rind identische Subtypen des *eae*-Gens festgestellt werden. Die von China et al. (18) darüberhinaus getesteten Serogruppen O5, O15, O18, O20 und O118 ergaben etwas variablere Ergebnisse. Die beta-Variante des *eae*-Gens war häufiger mit dem Auftreten klinischer Symptome assoziiert, während bei einem Drittel der EPEC durchfallkranker Kälber andere als die alpha-, beta- oder gamma-Varianten des *eae*-Gens vorkamen. Die Differenzierung zwischen bovinen und humanen EHEC's, die zur selben O-Serogruppe gehörten, konnte jedoch mit diesen Gensonden nicht erfolgen (18).

Die Ähnlichkeit zwischen bovinen und humanen EHEC's sowie die zunehmende Isolierung von Stämmen der Serogruppe O118 auch vom Menschen (17, 83, 84, 105) gab Anlaß zu der vorliegenden Untersuchung, in deren Mittelpunkt die Frage stand, ob es sich bei den beim Rind gefundenen STEC möglicherweise um typische EHEC handelt, die somit als Zoonoseerreger eine Bedeutung für den Menschen spielen können.

Die Untersuchung der *E.coli*-O118-Isolate auf die typischen EHEC-Virulenzmerkmale ergab, daß 90,8 % der Rinder das Shigatoxin, das EHEC-Hämolysin sowie das *eae*-Gen aufwiesen. Damit konnte gezeigt werden, daß sie den vom Menschen isolierten Stämmen in ihren Eigenschaften sehr ähnlich waren. Dies sollte durch Untersuchung der Klonalität der Isolate näher charakterisiert werden. Die dabei herausgefundenen Verwandtschaftsgrade erreichten bei mehreren Stämmen 100 %.

Das hervorstechendste Beispiel war der von Weber et al. (105) veröffentlichte Fall eines an Durchfall erkrankten Kindes, bei dem eine EHEC-Infektion nachgewiesen wurde. Dabei deutete der Vorbericht auf eine mögliche Kontaktinfektion hin, da das Kind mit einem gesunden Kalb Kontakt hatte. In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, daß ein vom Kalb isolierter O118-STECC-Stamm mit allen untersuchten Methoden identisch war mit jenem Stamm, der vom erkrankten Kind isoliert wurde.

Die Makrorestriktionsanalyse mit den beiden Restriktionsenzymen *BlnI* und *XbaI* konnte durch eine Übereinstimmung des Bandenmusters eine 100 %ige Identität der Stämme beweisen.

Innerhalb der Rinderstämme machte die klonale Analyse eine endemische Verteilung gemäß ihrer geographischen Herkunft sichtbar, was darauf hinweist, daß die Stämme schon lange in der Rinderpopulation vorhanden sein müssen. Gleichzeitig kann man daraus folgern, daß die in den jeweiligen Regionen vertretenen Klone im Zuge ihrer Evolution eine Virulenz für Kälber entwickelt haben.

Damit ist auch die Ansteckungsgefahr für den Menschen durch Kontakt mit Ausscheidertieren erhöht. Die endemische Verteilung zeigte sich darin, daß Stämme aus verschiedenen Regionen der Bundesrepublik aber auch aus Belgien, Kanada und der Schweiz eigene, näher miteinander verwandte Untergruppen bildeten. Zusätzlich konnte eine Gruppenbildung gemäß der unterschiedlichen Serovare beobachtet werden. Ähnliches galt für die klonale Verwandtschaft der Humanisolate untereinander. Auch dort konnten je nach geographischer Herkunft und untersuchter Serovare Untergruppen gebildet werden. Auffallend war, daß sowohl bei den Rinder- als auch bei den Humanisolaten Stämme aus Spanien und der BRD teilweise eine bis zu 100 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters aufwiesen. Beim klonalen Vergleich der Rinder- und Humanstämme gegeneinander fielen weitere Isolate auf, die eine 100 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters aufwiesen. Darunter waren sowohl Stämme von Rindern und Menschen, die innerhalb ihrer Wirtsspezies identisch waren, als auch solche, die speziesübergreifend zu 100 % übereinstimmten. Auffällig war, daß die Isolate vom Menschen gleichmäßig zwischen den Rinderstämmen verteilt waren. Dieses Ergebnis zeigt, daß bei Mensch und Rind die gleichen Isolate vorkommen und Rinder grundsätzlich als Erregerreservoir für STEC angesehen werden müssen.

Die bisher fast ausschließlich vertretene Annahme, daß eine Infektion des Menschen nur über den Verzehr kontaminierter Lebensmittel erfolgt (12, 49, 119), muß ebenfalls dahingehend korrigiert werden, daß auch eine Infektion über Kontakt mit Rindern möglich ist.

Die ebenfalls analysierten fünf O118-Isolate vom Schwein wiesen keine der hier untersuchten EHEC-typischen Virulenzmerkmale auf und konnten in der klonalen Analyse einem eigenen Cluster zugeordnet. Das bedeutet, daß Stämme dieser Serovar keinerlei Verwandtschaft zu Humanisolaten zeigen und daher hinsichtlich ihrer Virulenz für den Menschen eine untergeordnete Rolle spielen. Auch aus der Literatur ist bekannt, daß STEC beim Schwein im Vergleich zum Rind eher seltener gefunden werden. Sie stehen dann im Zusammenhang mit blutigem Durchfall bzw. der Ödemkrankheit beim Ferkel (7, 36, 57). Dagegen kommen STEC beim Schaf und bei der Ziege häufiger vor (7).

Der hier analysierte O118:NM-Stamm einer Ziege aus der Schweiz verfügte über alle EHEC-typischen Virulenzmerkmale und zeigte auch in der klonalen Analyse eine große Verwandtschaft (90 % nach *BlnI*-Verdau) zu bovinen Stämmen aus der Schweiz, was Anlaß zu der Vermutung gibt, daß STEC beim Wiederkäuer sehr ähnlich sind.

Die hier untersuchte Serogruppe O118 wies hinsichtlich ihrer Geißelantigene eine große Variabilität auf, die in dieser Form in der Literatur noch nicht bekannt war.

Neben den nicht klassifizierbaren unbeweglichen O118:NM-Stämmen gab es solche, die mit den H-Antigenen H16, H30, H12 und H9 ausgestattet waren, wobei die Mehrzahl der Isolate das Antigen H16 aufwies. Aus der Literatur ist für die Serogruppe O118 weiterhin das Geißelantigen H2 bekannt (40), das erst kürzlich bei einer EHEC-Epidemie in einer japanischen Schule gefunden wurde, so daß man momentan bei dieser Serogruppe fünf H-Antigene nachweisen kann.

Die klonale Analyse ergab, daß sich je nach gewähltem Enzym Cluster bildeten, denen bestimmte H-Antigene zugeordnet werden konnten. Diese H-Antigenspezifischen Gruppen wiederum verfügten über ganz bestimmte Virulenzmerkmale und wurden jeweils bei bestimmten Spezies gefunden. Isolate der Serovar O118:H9:K- traten nur beim Schwein auf und besaßen keine der hier untersuchten Virulenzfaktoren.

Die Isolate humaner Herkunft waren mit Ausnahme eines O118:NM Stammes drei Serovaren zuzuordnen: Stämme der Serovar O118:H16 verfügten über das *stx1*, das *eae*-Gen, die Serinprotease EspP sowie das Hly<sub>EHEC</sub>. Stämme der Serovar O118:H30 besaßen *stx2* und das *eae*-Gen, während Stämme der Serovar O118:H12 lediglich *stx2* aufwiesen.

Vier der 29 O118-Isolate vom Menschen stammten von Patienten mit HUS. Die Stämme sind somit als hochvirulent einzuschätzen. Die Ausbildung dieses Krankheitsbildes war jedoch nicht begrenzt auf *stx2*-positive Stämme, da zwei der drei Isolate *stx1* bildeten. Damit unterscheidet sich die O118-Serogruppe von den bisher am intensivsten untersuchten O157:H7-Stämmen, von denen bekannt ist, daß *stx2*-positive Stämme häufiger HUS verursachen als andere (80). Die Definition der Rolle spezifischer Virulenzfaktoren in unterschiedlichen Serotypen bekommt somit ebenfalls eine neue Bedeutung und macht klar, daß z.B. über die Rolle wirtsspezifischer Faktoren noch kaum Wissen vorhanden ist.

Beim Rind wurden neben der Serovar O118:NM ausschließlich Stämme der Serovar O118:H16 gefunden, nicht jedoch solche der beim Menschen isolierten Serovare O118:H2, O118:H12 und O118:H30. Damit kann die Aussage, daß bovine STEC der Serogruppe O118 als potentielle Zoonoseerreger von EHEC-Infektionen beim Menschen angesehen werden müssen, nur für Stämme der Serovare O118:H16 und O118:NM aufrecht erhalten werden. Dies wirft die interessante Frage auf, wo das Reservoir der übrigen STEC-Pathogene der Serogruppe O118 liegt. Jedenfalls wird deutlich, daß neben dem Rind, welches weltweit als wichtigstes STEC-Reservoir angesehen wird (49, 120), offensichtlich andere Ansteckungsquellen bzw. evt. sogar Reservoirs existieren, die uns derzeit noch nicht bekannt sind. Daher sollte unserer Ansicht nach in der routinemäßigen Diagnostik der Nachweis von EHEC nicht nur die Serovar O157:H7 beeinhaltend sondern auch auf die Serovar O118 ausgedehnt werden. Neben der spezifischen Serotypisierung könnte der Antikörpernachweis in der Objektträgeragglutination gegen das Intimin *eae*-positiver Stämme ein gutes Diagnostikum für die Serovar O118 darstellen, da diese Stämme als Pathogene eine größere Bedeutung besitzen.

Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Arbeit war die Feststellung, daß mit Ausnahme eines Stammes alle O118:NM Isolate über die gleichen Virulenzfaktoren wie die O118:H16 Stämme verfügten und nach den klonalen Analysen in einer Gruppe clusterten. Die Beobachtung, daß sich diese Stämme lediglich durch ihre Geißelantigene unterschieden, veranlaßte uns dazu, die H-Antigene genauer zu analysieren.

Das H-Antigen von *Escherichia coli* ist durch eine einzelne strukturelle Untereinheit, das Flagellin, gekennzeichnet, die durch das *fliC*-Gen kodiert wird (58, 89). Zur Zeit sind 53 antigene H-Typen bekannt (58), die in Kombination mit dem O-Antigen häufig mit bestimmten Bakterienklonen assoziiert sind, die spezifische Krankheitsbilder hervorrufen (1, 78, 92).

In Anlehnung an Arbeiten von Fields et al. (32), die eine PCR-Analyse zur Differenzierung des *fliC*-Gens von O157:H7 und O157:NM beschrieben, konnten wir das für das Geißelantigen kodierende *fliC*-Gen nachweisen. Mit Ausnahme des unbeweglichen O118:H Stammes 31W/Orskov zeigten nach Restriktion mit der Endonuklease *RsaI* alle O118:NM-Stämme DNS-Banden, die in ihrer Größe mit denen der O118:H16 übereinstimmten, sich jedoch von denen der Serovare O118:H12, O118:H30, O157:H7 und O26:H deutlich unterschieden. An dieser Stelle möchten wir darauf hinweisen, daß die Bezeichnung "H" für den Stamm 31W/Orskov (77) unserer Ansicht nach nicht korrekt ist, da dieses Isolat zwar unbeweglich ist, jedoch eindeutig über ein H-Antigen verfügt (genotypischer Nachweis mittels PCR). Wir bevorzugen daher als Bezeichnung für unbewegliche Stämme den englischen Ausdruck "Non Motile" (NM).

Die elektronenmikroskopisch dargestellten Geißeln der O118:H16- und O118:NM-Stämme, die eine deutlich geringere Länge als die Geißeln der übrigen Serovaren aufwiesen, waren morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Auch dies weist auf eine große Verwandtschaft von Stämmen dieser beiden Serovare hin. Hier stellt sich die Frage, ob im Laufe der Evolution manche O118:H16-Stämme durch Mutation im *fliC*-Gen ihre Fähigkeit zur Bewegung verloren haben und daraus die O118:NM entstanden sind oder ob unbewegliche O118:NM-Isolate eine Geißel ausbildeten und dadurch virulenter wurden.

Da die Geißel als Oberflächenantigen einem großen Selektionsdruck unterliegt, erscheint die Möglichkeit einer stattgefundenen Mutation mit anschließender klonaler Verbreitung dieser Stämme als sehr wahrscheinlich. Für dieses Szenario spricht auch die Tatsache, daß die O118:NM-Stämme in den erstellten Dendrogrammen innerhalb der O118:H16-Stämme willkürlich verteilt waren.

Vergleichende Analysen der Aminosäuresequenz des Flagellins verschiedener Bakterienspezies haben gezeigt, daß das C- und N-terminale Ende des Moleküls, das für Sekretion und Polymerisation verantwortlich ist, zwischen den Spezies konserviert ist, während die zentrale Region, die den Oberflächen-exponierten antigenen Teil des Flagellinfilamentes darstellt, sowohl innerhalb als auch zwischen den Spezies hoch variabel ist (58). Studien an *Salmonella enterica*-Stämmen bezüglich der Variabilität der zentralen Region im Flagellinmolekül haben zur Aufstellung zweier Hypothesen geführt: die erste Hypothese vertritt die Ansicht, daß diese Region durch die schnelle Fixation neutraler Mutationen als Folge genetischer Drift eine Art "ungezwungene Evolution" durchläuft (106). Die zweite wahrscheinlichere (93) Hypothese besagt, daß lateraler Gentransfer und die Rekombination fremder DNS die Hauptvariationsquellen für die Entstehung neuer *fliC*-Allele und damit antigenen Vielfalt darstellen (96, 97). In beiden Fällen spielt die natürliche Selektion eine große Rolle: sie fungiert in einigen Teilen des Moleküls als konservative Kraft gegen den Aminosäureaustausch und kann andererseits eine diversifizierende Rolle einnehmen, indem sie den Proteinpolyorphismus und damit die schnelle Evolution vorantreibt.

Um die molekulare Basis der antigenen Variation pathogener *E.coli*-Stämme zu untersuchen, müßte das *fliC*-Gen sämtlicher H-Antigenvarianten sequenziert und die entstehenden Nucleotidmuster computerbasiert miteinander verglichen werden. Nur so können früher stattgefundenen Rekombinationsereignisse, die Segmente des Flagellins betreffen, aufgedeckt bzw. Vorgänge von natürlicher Selektion beurteilt werden.



Die erzielten Ergebnisse reflektieren die klonale Verbreitung von pathogenen *E. coli* und geben weitere Einblicke in das Verständnis bakterieller Evolution und Pathogenese. Dabei wurden Stämme, die in ihrem Bandenmuster zu mehr als 95 % übereinstimmten, als zu einem Klon gehörig definiert. Stämme mit Verwandtschaftsgraden unter 50 % wurden als entfernt verwandt eingestuft, während Stämme mit 100 % übereinstimmendem Bandenmuster als identisch betrachtet wurden.

Die unterschiedlichen Cluster, die anhand der verschiedenen Makrorestriktionsmuster berechnet werden konnten, zeigen eine enge Verwandtschaft zwischen den pathogenen Stämmen der jeweiligen Serovare O118:H16, O118:H30, O118:H12 sowie O118:H9. Das bedeutet, daß sich bestimmte Klone dieser Serovare im Laufe der Evolution gegenüber anderen Klonen durchsetzen konnten. Innerhalb der Cluster zeigen die Stämme eine teilweise bis zu 100 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters und ihrer Virulenzmerkmale, während sie mit Stämmen der jeweiligen anderen Cluster in einem viel geringeren Ausmaß verwandt sind. Je variabler die Stämme in den Clustern verteilt sind, umso länger sind sie schon in der Population vorhanden.

Diese Ergebnisse untermauern die von Whittam (111) aufgestellte Theorie, daß pathogene *E.coli* eine klonale Populationsstruktur aufweisen, die durch ein breites Wirtsspektrum und eine große geographische Verteilung gekennzeichnet ist. Die Mehrzahl der Stämme, die in einem bestimmten Land isoliert wurden, fanden sich auch in einer gemeinsamen Gruppe wieder. Es konnten jedoch auch Verwandtschaften zwischen Isolaten festgestellt werden, die aus geographisch weit voneinander entfernten Gebieten isoliert worden waren. So waren Stämme aus Spanien zu 100 % identisch in ihrem Bandenmuster mit Isolaten aus Hessen bzw. Niedersachsen oder Stämme aus Kanada zu über 75 % verwandt mit Isolaten aus Nordrhein-Westfalen. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß sich bestimmte Klone weltweit stärker verbreitet haben als andere und dabei auch größere geographische Entfernungen überwunden haben müssen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Position des O118:H- Stammes 31-W/Orskov, der 1948 von einem an Septikämie erkrankten Kalb in Schweden isoliert wurde (77). Dieser Stamm bildet ein eigenes Cluster und unterscheidet sich von den übrigen O118-Isolaten dadurch, daß er als einziges Virulenzmerkmal das *espP*-Gen aufweist. Dieses Gen, das für eine Serinprotease kodiert, war bisher nur bei EHEC-Stämmen (13, 24) bekannt. Bei diesen Stämmen ist das *espP*-Gen auf einem großen Virulenzplasmid lokalisiert, umgeben von Überbleibseln unterschiedlicher Insertionssequenzen. Es ist verantwortlich für die Spaltung des humanen Gerinnungsfaktors V (13, 24). DNS-Analysen der Regionen in unmittelbarer Nachbarschaft zum *espP* könnten weitere Informationen über die Evolution dieses Gens liefern.

Im Hinblick auf die Eignung der in der Makrorestriktion eingesetzten Endonukleasen *BlnI* und *XbaI* konnte festgestellt werden, daß *XbaI* so viele Banden erbrachte, daß sich eine Analyse der Verwandtschaften als schwierig erwies. Ergebnisse, die mit *BlnI* erzielt wurden, konnten dagegen aufgrund der geringeren Bandenanzahl problemlos ausgewertet werden, so daß der Verwendung des *BlnI* in Studien wie der vorliegenden in Zukunft der Vorrang gegeben werden sollte. Nach unseren Untersuchungen waren die Analysen mit *XbaI* zu diskriminativ.

Die Untersuchung und Charakterisierung von Virulenzfaktoren, über die bestimmte pathogene *E.coli* verfügen müssen, um definierte Krankheiten hervorrufen zu können, wird nach wie vor ein wichtiges Anliegen bleiben, um die Evolutionsvorgänge und Wirtsadaptationen dieser hochvariablen Pathogene zu begreifen. Wir hoffen, mit dieser Arbeit dem Verständnis ein wenig näher gekommen zu sein.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 89 Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)-, vier Enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC)- und sieben nicht-STEC/nicht-ETEC-Stämme der Serogruppe O118 phäno- und genotypisch auf den Grad ihrer Verwandtschaft untersucht. Von den 100 Stämmen waren 29 von Menschen, 65 von Rindern, fünf von Schweinen und ein Isolat von einer Ziege isoliert worden. Alle Stämme wurden serotypisiert und mittels DNS-DNS-Hybridisierung sowie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf die Virulenzmerkmale *stx* (Shigatoxin-Allele), *eae* (Intimin-Gen) und *espP* (Gen für die Serinprotease EspP) untersucht. Der Nachweis des Hämolytins Hly<sub>EHEC</sub> erfolgte im modifizierten Kulturverfahren unter Verwendung von Waschblutagar. Die genomische DNS der Stämme wurde einer Makrorestriktionsanalyse mit den beiden Restriktionsendonukleasen *BlnI* und *XbaI* unterzogen. Die Ähnlichkeit der erzeugten Bandenmuster wurde mit Hilfe der "unweighted pair group method analysis" (UPGMA) mit arithmetischen Mitteln quantifiziert. Darüberhinaus wurden ausgewählte Stämme mit den Methoden der PCR, der Anzucht in Hitchens-Agar sowie der Elektronenmikroskopie auf das Vorhandensein des Strukturgens für das Geißelschaftprotein *fliC* bzw. die Expression und Funktion der Bakteriengeißel untersucht.

Wie die Untersuchungen ergab, ließen sich die O118-Stämme anhand von ihren H-Antigentypen (9, 12, 16, 30, NM) fünf verschiedenen Serovaren zuordnen. 90,8 % (59/65) aller Rinderstämme verfügten wenigstens über die drei Virulenzmerkmale *stx*, Hly<sub>EHEC</sub> und *eae*. Die Kombination aller vier untersuchten Virulenzmerkmale (*stx*, Hly<sub>EHEC</sub>, *eae* und *espP*) kam aber deutlich häufiger bei den bovinen (54/63; 85,7 %) als bei den humanen (16/25; 64,0 %) STEC-Stämmen vor. In den durch Makrorestriktion erzeugten Bandenmustern stimmten die verschiedenen O118-Stämme zwischen 40 und 100 % überein. Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Makrorestriktionsprofile ließen sich sowohl die Stämme von Tieren als auch die Stämme von Menschen in drei Cluster einteilen (*BlnI*: A<sub>T</sub>, B<sub>T</sub>, C<sub>T</sub> bzw. A<sub>M</sub>, B<sub>M</sub>, C<sub>M</sub>, *XbaI*: D<sub>T</sub>, E<sub>T</sub>, F<sub>T</sub> bzw. D<sub>M</sub>, E<sub>M</sub>, F<sub>M</sub>).

Diese Gruppierung war weitestgehend deckungsgleich mit der Gruppierung anhand der H-Antigentypen und korrelierte mit dem Vorhandensein eines *stx*-Gens, der Wirtsspezies sowie dem Herkunftsland der Stämme. O118-Stämme mit den H-Antigenen 30 und 12 bildeten jeweils eine eigene, abgrenzbare Gruppe, besaßen ein *Stx*-Gen und stammten ausschließlich von Menschen. Eine weitere Gruppe umfaßte alle O118-Stämme mit dem H-Antigen 9. Diese besaßen kein Toxinogen und stammten alle von Schweinen. Stämme der Serovare O118:H16 und O118:NM bildeten eine große, genetisch heterogene STEC-Gruppe, innerhalb der der Verwandtschaftsgrad der Makrorestriktionsprofile weder mit dem H-Antigentyp noch der Wirtsspezies (Mensch, Rind, Ziege) oder der geographischen Herkunft korrelierte. Besonders hervorzuheben war der Fall eines 2-jährigen Jungen in Bayern, der infolge einer Infektion mit einem EHEC-O118:H16-Stamm erkrankt war und der nachweislich Kontakt zu einem gesunden Kalb hatte, bei dem ebenfalls ein O118:H16 Stamm isoliert werden konnte. Die beiden Stämme waren in allen getesteten Merkmalen völlig identisch.

Bei der näheren Untersuchung von ausgewählten O118:H16- und O118:NM-Stämmen (n= 9) konnte das Gen für das Geißelprotein *fliC* bei allen Vertretern der beiden Serovare nachgewiesen werden. Ferner waren elektronenmikroskopisch bei all diesen Stämmen Geißeln sichtbar, die im Gegensatz zu denen der Serovare O118:H30 und O118:H12 deutlich kürzer waren. Im Hitchens-Agar waren aber nur die O118:NM-Stämme unbeweglich.

Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß *E.coli* mit der O-Antigendeterminante 118 eine heterogene Gruppe genetisch verwandter Erreger darstellen. Es lassen sich mindestens drei verschiedene klonale STEC-Linien erkennen, deren divergente Entwicklung mit Mutationen in Genen der Geißelbildung und/oder -funktion einherging, wenn sie nicht sogar dadurch mit verursacht wurde. Die Ähnlichkeit der Makrorestriktionsprofile läßt einen gemeinsamen Vorfahren für die Stämme der beiden Serovare O118:H16 und O118:NM in der jüngeren Vergangenheit vermuten.

Andererseits spricht die bei diesen Stämmen mangelnde Korrelation zwischen den Makrorestriktionsprofilen und den H-Typen gegen die These, daß beide Serovare sich in einem einfachen bidirektional-divergenten Prozeß voneinander fortentwickelt hätten. Eine Reservoirfunktion des Rindes konnte bislang nur für STEC der Serovare O118:H16 und O118:NM nachgewiesen werden. Die völlige Übereinstimmung der beiden O118:H16-Isolate von einem Kind und einem Kalb auf demselben Bauernhof läßt auf eine Erregerübertragung zwischen dem Kalb und dem Kind schließen und weist auf die besonders große Bedeutung dieses Serovars als Zoonoseerreger hin.

## Summary

In the present study clonal relationships were investigated in a worldwide collection of 100 *Escherichia coli* strains of serogroup O118 comprising 89 strains of Shigatoxin-producing *E.coli* (STEC), 4 strains of enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), and 7 non-STEC/non-ETEC strains. A total of 29 strains from humans, 65 strains from cattle, 5 strains from pigs and one strain from a goat were compared by serotyping, virulence typing and macrorestriction analysis. All strains were tested for virulence-associated genes *stx* (Shigatoxin alleles), *eae* (Intimin gene), and *espP* (Serinprotease EspP gene) by DNA-DNA-hybridization and polymerase chain reaction (PCR). Hly<sub>EHEC</sub> was detected by bacterial culture on agar containing washed sheep erythrocytes. Macrorestriction analysis was performed utilizing a pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique for the separation of genomic DNA restriction fragments generated with endonucleases *BlnI* and *XbaI*. The similarities between PFGE banding patterns were quantitated by the "unweighted pair group method analysis" (UPGMA) with arithmetic means. Selected strains were examined for the presence of the *fliC* gene (major structural protein of the flagella filament), the expression of the flagella, and the motility of the bacterial cells by PCR, bacterial culture in Hitchens agar and electron microscopy, respectively.

The study revealed that *E.coli* strains of serogroup O118 belonged to five different serovars according to their H antigen determinants (9, 12, 16, 30, NM). 90,8 % (59/65) of all cattle strains exhibited at least the three virulence traits *stx*, Hly<sub>EHEC</sub> and *eae*. However, the combination of *stx*, Hly<sub>EHEC</sub>, *eae*, and *espP* was detected considerably more frequently in bovine strains (54/63; 85,7 %) than in human STEC strains (16/25; 64,0 %). The similarities of the PFGE banding patterns ranged between 40 and 100 %. Based on these similarities both the animal strains and the human strains clustered into three groups each (*BlnI*: A<sub>T</sub>, B<sub>T</sub>, C<sub>T</sub> bzw. A<sub>M</sub>, B<sub>M</sub>, C<sub>M</sub>, *XbaI*: D<sub>T</sub>, E<sub>T</sub>, F<sub>T</sub> bzw. D<sub>M</sub>, E<sub>M</sub>, F<sub>M</sub>, respectively).

This clustering was almost identical with the classification of strains by their H antigens. Furthermore, the clustering also correlated well with the carriage of a *stx* gene and the source (host species, country) of the strains. O118 strains expressing the H30 antigen as well as those strains expressing H12 formed a distinct group each, harboured a *stx* allele and had been isolated from humans only. Another group consisted of O118:H9 non-STEC/non-ETEC strains only and all of these were porcine strains. Based on their macrorestriction profiles the O118:H16 and O118:NM strains clustered into a distinct, large, but genetically heterogeneous STEC group of strains from humans, cattle, and goat. However, within this group macrorestriction profile typing, serotyping and the host (human, cattle, goat) or geographical origins did not correlate. The case of a two-year-old boy in Bavaria, Germany, was of particular interest, because he suffered from diarrhea and proved infected with a O118:H16 EHEC strain. He lived on a farm and had had contact to a healthy calf from which an O118:H16 strain had been isolated as well. Both isolates were completely identical in all tests applied.

The examination of selected strains of serovars O118:H16 and O116:NM (n= 9) revealed that the *fliC* gene was constantly present in both serovars. Furthermore, flagella-like structures were detected in both serovars by electron microscopy. However, these structures were markedly shorter than those observed in strains of O118:H12 and O118:H30. In contrast to all other strains tested, strains of O116:NM were generally non motile.

These results suggest that *E.coli* carrying the O118 determinant represent a heterogeneous but related group of pathogens whose divergent evolution has been accompanied if not been causatively driven by mutations in genes responsible for flagella expression and/or function. This group includes at least three distinct clonal lineages of STEC represented by O118:H12, O118:H30, and O118:H16/NM strains. The similarities between their macrorestriction profiles suggest that strains of serovars O118:H16 and O118:NM have a common ancestor.

However, these profiles also contradict the hypothesis that both serovars have separated in a simple bidirectional-divergent process. In the present study, bovins have been identified as reservoirs for STECS of serovars O118:H16 and O118:NM only. The finding of two completely identical O118:H16 STEC strains in a child and a calf on the same farm supports the idea that this STEC serovar is an important zoonotic pathogen.



## 7. Literaturverzeichnis

1. **Achtman, M., and G. Pluschke.** 1986. Clonal analysis of descent of virulence among selected *Escherichia coli*. *Annu.Rev.Microbiol.* **40**:185-210
2. **Arbeit, R.D., M. Arthur, R. Dunn, C. Kim, R.K. Selander, and R. Goldstein.** 1990, Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J.Infect.Dis.* **161**:220-235
3. **Asaka, J., T. Fujiwara, K. Fujiwara, G. Kuwajima, E. Kondo, and M. Shin.** 1988, DNA coding Flagellin and vector containing SAID DNA. Patent: JP 1988012286-A 1 19-Jan-1988; Shionogi & Co LTD
4. **Baldwin, T.J., S. Knutton, L. Seller, H.A.M. Manjarrez Hernandez, A. Aitken, and P.H. Williams.** 1992. Enteroaggregative *Escherichia coli* secrete a heat-labile toxin antigenetically related to *Escherichia coli* hemolysin. *Infect.Immun.* **60**:2092-2095
5. **Benkel, P., M. Hudel, and T. Chakraborty.** 1997. The localization of the LEE-region in the O26:H- Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain 413/89-1. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Jena, Germany, abst. no. P196, p.53
6. **Benz, I., and M.A. Schmidt.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **52**:334-336

7. **Beutin, L., D. Geier, H. Steinrück, S. Zimmermann, and F. Scheutz.** 1993. Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J.Clin.Microbiol.* **31(9)**:2483-2488
8. **Bilge, S.S., C.R. Clausen, W. Lau, and S. L. Moseley.** 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *J.Bacteriol.* **171**:4281-4289
9. **Bilge, S.S., J.J.C. Vary, S.F. Dowell, and P.I. Tarr,** 1996. Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. & Immun.* **64**:4795-4801
10. **Bisercic, M., J.Y. Fentrier, and P.R. Reeves.** 1991. Nucleotide sequences of the *gnd* genes from nine natural isolates of *Escherichia coli*: evidence of intragenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic *gnd* locus. *J.Bacteriol.* **173**:3894-3900
11. **Blanco, J., E.A. Gónzales, S. García, M. Blanco, B. Regueiro, and I. Bernádez.** 1988. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhea in Galicia (North-western Spain). *Vet.Microbiol.* **18**:297-311
12. **Bockemühl, J., and H. Karch.** 1996. Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). *Bundesgesundheitsblatt* **39**:290-296
13. **Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch.** 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol.Microbiol.* **24**:767-778

14. **Cantey, J.R., and R.K. Blake.** 1977. Diarrhea, due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J.Infect.Dis.* **135**:454-462
15. **Cantey, J.R., and D.S. Hosterman.** 1979. Characterization of colonization of the rabbit gastrointestinal tract by RDEC-1. *Infect.Immun.* **26**:1099-1103
16. **Caprioli, A., V. Falbo, F.M. Ruggeri, L. Baldassarri, R. Bisicchia, G. Ippolito, E. Romoli, and G. Donelli.** 1987. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J.Clin.Microbiol.* **25**:146-149
17. **Caprioli, A., I. Luzzi, F. Rosmini, C. Resti, A. Edefonti, F. Perfumo, C. Farina, A. Goglio, A. Gianveti, and G. Rizzoni.** 1994. Communitywide outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J.Infect.Dis.* **169**:208-211
18. **China B, E. Jacquemin, A.C. Devrin, Y. Pirson, and J. Mainil.** 1999. Heterogeneity of the *eae* genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res.Microbiol.* **150(5)**:323-32
19. **Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, and F. Uribe.** 1991. Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet*, **337**:262-264
20. **Dean-Nystrom EA, BT. Bosworth, WC. Cray Jr, and HW. Moon.** 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect.Immun.* **65(5)**:1842-1848

21. **De Grandis, S., J. Ginsberg, M.W. Toone, S. Climie, J. Friesen, and J.L. Brunton.** 1987. Nucleotide sequence and promotor mapping of the *Escherichia coli* shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *J.Bacteriol.* **169**:4313-4319
22. **De Rycke, J., E.A. Gónzales, J. Blanco, E. Oswald, M. Blanco, and R. Boivin.** 1990. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J.Clin.Microbiol.* **28**:694-699
23. **De-Sauvage, F.J., R. Horuk, G. Bennett, C. Quan, J.B. Burnier, and D.V. Goeddel.** 1992. Characterization of the recombinant human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J.Biol.Chem.* **267**:6479-6482
24. **Djafari, S., F. Ebel, C. Deibel, S. Krämer, M. Hudel, and T. Chakraborty.** 1997. Characterization of an exported protease from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **25**:771-784
25. **Donnenberg, M.S., J.A. Giron, J.P. Nataro, and J.B. Kaper.** 1992. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol.Microbiol.* **6**:3427-3437
26. **Donnenberg, M.S., C.O. Tacket, S.P. James, G. Losonsky, J.P. Nataro, S.S. Wasserman, J.B. Kaper, and M.M. Levine.** 1993. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J.Clin.Invest.* **92**:1412-1417
27. **DuBose, R.F., D.E. Dykhuizen, and D.C. Hartl.** 1988. Genetic exchange among natural isolates of bacteria: recombination within the *phoA* gene of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **85**:7036-7040

28. **Duhamel, G.E., R.A. Moxley, and C.W. Maddox.** 1992. Enteric infection of a goat with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (O103:H2). *J.Vet.Diagn.Invest.* **4**:197-200
29. **DuPont, J.L., S.B. Formal, R.B. Hornick, M.J. Snyder, J.P. Libonati, D.G. Sheahan, E.H. Labrec, and J.P. Kalas.** 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N.Engl.J.Med.* **285**:1-9
30. **Dykhuisen, D.E., and Green, L.** 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the Definition of Biological Species. *J.Bacteriol.* **173**:7257-7268
31. **Falbo, V., M. Famiglietti, and A. Caprioli.** 1992. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. *Infect.Immun.* **60**:2182-2187
32. **Fields, P.I., K. Blom, H.J. Hughes, L.O. Hesel, P. Feng, and B. Swaminathan.** 1997. Molecular Characterization of the Gene Encoding H Antigen in *Escherichia coli* and Development of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Test for Identification of *E.coli* O157:H7 and O157:NM. *J.Clin.Microbiol.* **35**:1066-1070
33. **Fischer, J., C. Maddox, R. Moxley, D. Kinden, and M. Miller.** 1994. Pathogenicity of a bovine attaching and effacing *Escherichia coli* isolate lacking shiga-like toxins. *Am.J.Vet.Res.* **55**:991-999
34. **Forte, L.R., P.K. Thorne, S.L. Eber, W.J. Krause, R.H. Freeman, S.H. Francis, and J.D. Corbin.** 1992. Stimulation of intestinal Cl<sup>-</sup> transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am.J.Physiol.* **263**:C601-C615

35. **Fuji, Y., M. Hayashi, S. Hitostubashi, Y. Fuke, H. Yamanaka, and K. Okamoto.** 1991. Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. J.Bacteriol. **173**:5516-5522
36. **Gannon, V.P.J., C.L. Gyles, and R.W. Friendship.** 1988. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. Can.J.Vet.Res. **52**:331-337
37. **Giron, J.A., M.S. Donnenberg, W.C. Martin, K.G. Jarvis, and J.B. Kaper.** 1992. Distribution of the Bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. J.Infect.Dis. **168**:1034-1041
38. **Griffin, P.M., and R.W. Tauxe.** 1991, The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol.Rev. **13**:60-98
39. **Hartl, D.L., and D.E. Dykhuizen.** 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. Ann.Rev.Genet. **18**:31-68
40. **Hashimoto, H., K. Mizukoshi, M. Nishi, T. Kawakita, S. Hasui, Y. Kato, Y. Ueno, R. Takeya, N. Okuda, and T. Takeda.** 1999. Epidemic of Gastrointestinal Tract Infection Including Hemorrhagic Colitis Attributable to Shiga Toxin 1-producing *Escherichia coli* O118:H2 at a Junior High School in Japan. Pediatrics Vol. **103** No. 1 p.e2
41. **Heuvelink, A.E., N.C.A.J. van de Kar, J.F.G.M. Meis, L.A.H. Monnens, and W.J.G. Melchers.** 1995. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolates from patients with haemolytic uraemic syndrome in Western Europe. Epidemiol. Infect. **115**:1-14

42. **Holmes, R.K., E.M. Twiddy, and C.L. Pickett.** 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **53**:464-473
43. **Holmgren, J., M. Lindblad, P. Fredman, L. Svennerholm, and M. Myrvold.** 1985. Comparison of receptors for cholera and *Escherichia coli* enterotoxins in human intestine. *Gastroenterol.* **89**:27-35
44. **Imberechts, H., H. De Greve, and P. Lintermans.** 1992. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet.Microbiol.* **31**:221-233
45. **Jackson, M.P., R.J. Neill, A.D. O'Brien, R.K. Holmes, and J.W. Newland.** 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**:109-114
46. **Janke, B.H., D.H. Francis, J.E. Collins, M.C. Libal, D.H. Zeman, and D.D. Johnson.** 1989. Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs and dogs. *J.Vet.Diagn.Invest.* **1**:6-11
47. **Jerse, A.E., J. Yu, B.D. Tall, and J.B. Kaper.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **87**:7839-7843
48. **Jerse, A.E., and J.B. Kaper.** 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect.Immun.* **59**:4302-4309
49. **Karmali, M.A.** 1989. Infections by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol.Rev.* **2**:15-38

50. **Karmali, M.A., M. Petric, C. Lim, P.C. Fleming, G.S. Arbus, and H. Lior.** 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J.Infect.Dis.* **151**:775-782
51. **Kennan, R.M., and R.P. Moncktor.** 1990. Adhesive fimbriae associated with porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of the O141 serotype. *J.Clin.Microbiol.* **28**:2006-2011
52. **Kenny, B., B.B. Finlay, and M.S. Sonnenberg.** 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol.Microbiol., Apr.*, **20(2)**:313-323
53. **Law, D.** 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol.Rev.* **7**:152-173
54. **Levine, M.M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J.Infect.Dis.*, **155**:377-389
55. **Levine, M.M., J. Xu, J.B. Kaper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J. Nataro, H. Karch, and K. Wachsmuth.** 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J.Infect.Dis.* **156**:175-182
56. **Liebisch, B. and S. Schwarz.** 1996. Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar dublin. *J.Clin.Microb., März*, **34 (3)**: 641-646



57. **Linggood, M.A., and J.M. Thompson.** 1987. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease. *J.Med.Microbiol.* **25**:359-362
58. **Macuab, R.M.** 1996. Flagella and motility. p. 123-145. **In:** F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.C. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
59. **Mainil, J.G., C.J. Duschesnes, S.C. Whipp, L.R.M. Marques, A.D. O'Brien, T.A. Casey, and H.W. Moon.** 1987. Shiga-like toxin production and attaching and effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am.J.Vet.Res.* **48**:743-748
60. **Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, H.C., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C.G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S., and Shinagawa, H.** 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res.* **5 (1)**:1-9 (1998)
61. **Martin C.J., and Maiden et al.** 1998, Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *PNAS*, Vol. **95 (6)**:3140-3145
62. **Maynard Smith, J.** 1998. Microbial Evolution. **In:** Microbial Evolution and Infection, 50<sup>th</sup> DGHM Congress and 25<sup>th</sup> Annual DGI Meeting. Ed.: Ulf B. Göbel, Bernhard R. Ruf, Einhorn-Press Verlag

63. **Mazodier, P., and J. Davis.** 1991. Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu.Rev.Genet.* **25**:147-171
64. **McDaniel, T.K., K.G. Jarvis, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, Feb. 28; **92 (5)**:1664-8
65. **Milkman, R., and M.M. Bridges.** 1990. Molecular Evolution of the *Escherichia coli* Chromosome. III Clonal frames. *Genetics* **133**:455-468
66. **Milkman, R.** 1996. Recombinational Exchange among Clonal Populations. In: *E.coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*. Ed.: F.C. Neidhardt, pp.2663-2648
67. **Moon, H.W., S.C. Whipp, R.A. Argenzio, M.M. Levine, and R.A. Gionnella.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect.Immun.* **41**:1340-1351
68. **Moon, H.W., R.A. Schneider, and S.L. Moseley.** 1986. Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine. *Am.J.Vet.Res.* **47**:210-212
69. **Moseley, S.L., J.W. Hardy, M.I. Huq, P. Echeverria, and S. Falkow.** 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **39**:1167-1174
70. **Moseley, S.L., M. Samadpour-Motalebi, and S. Falkow.** 1983. Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **156**:441-443

71. **Moxley, R.A., and D.H. Francis.** 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect.Immun.* **53**:339-346
72. **Nataro, J.P., and J.B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol.Rev.* **11**:142-201
73. **O'Brien, A.D., T.A. Lively, M.E. Chen, S.W. Rothman, and S.B. Formal.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Lancet* **i**:702
74. **O'Brien, A.D., J.W. Newland, S.F. Miller, R.K. Holmes, H.W. Smith, and S.B. Formal.** 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science.* **226**:694-696
75. **O'Brien, A.D., L.R.M. Marques, C.F. Kerry, J.W. Newland, and R.K. Holmes.** 1989. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933. *Microbiol.Pathogen.* **6**:381-390
76. **Ochman, H., and R.K. Selander.** 1984. Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA,* **81**:198-201
77. **Ørskov, F.** 1952. Antigenic relationship between H antigens 1-22 of *E.coli* and Wramby's H antigens 23W-36W. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* **32**:241-244
78. **Ørskov, F., T.S. Whittam, A. Cravioto, and I. Ørskov.** 1990. Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to different O groups. *J.Infect.Dis.* **162**:76-81

79. **Ørskov, F., and I. Ørskov.** 1983. Summary of a Workshop on the Clone Concept in the Epidemiology, Taxonomy, and Evolution of the Enterobacteriaceae and other Bacteria. *J.Infect.Dis.* **148**:346-357
80. **Orstrov, S.M., P.I. Tarr, M.A. Neill, J.H. Lewis, B.N. Hargrett, and J.M. Kobayashi.** 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systematic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J.Infect.Dis.* **160**:994-998
81. **Pai, C.H., J.K. Kelly, and G.L. Meyers.** 1986. Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **51**:16-23
82. **Pickett, C.L., E.M. Twiddy, B.W. Belisle, and R.K. Holmes.** 1986. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **165**:348-352
83. **Piérard, D., G. Cornu, W. Proesmans, A. Dediste, F. Jacobs, J. Van de Walle, A. Mertens, J. Ramet, and S. Lauwers.** 1998. Hemolytic uremic syndrome in Belgium: incidence and association with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin.Microbiol.Infect.*
84. **Piérard, D., D. Stevens, L. Movian, H. Lior, and S. Lauwers.** 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin.Microbiol.Infect.* **3**:531-540
85. **Pohl, P., G. Daube, P. Lintermans, A. Kaeckenbeeck, and J. Mainil.** 1991. Description de 70 souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine possédant les gènes des vérotoxines. *Ann.Méd.Vét.* **135**:267-272

86. **Pospischi, A., J.G. Mainil, G. Baljer, and H. Moon.** 1987. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea. *Vet.Pathol.* **23**:330-334
87. **Pschyrembel.** 1994, *Klinisches Wörterbuch*, 257. neu bearb. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York
88. **Reeves, P.R.** 1992. Variation in O-antigens, niche-specific selection and bacterial populations. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**:509-516
89. **Reid, S.D., R.K. Selander, and T.S. Whittam.** 1999. Sequence Diversity of Flagellin (*fliC*) Alleles in Pathogenic *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **181**:153-160
90. **Scotland, S.M., H.R. Smith, G.A. Willshaw, and B. Rowe.** 1983. Vero cytotoxin production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* **ii**:216
91. **Selander, R.K., and B.R. Levin.** 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* **210**:545-547
92. **Selander, R.K., D.A. Caugant, and T.S. Whittam.** 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, p. 1625-1648. **In:** *E.coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. Ed.: F.C. Neidhardt
93. **Selander, R.K., J. Li, and K. Nelson.** 1996. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. p.2691-2707. **In:** F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.C. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.

94. **Seriwatana, J., P. Echeverria, D.N. Taylor, L. Rasrinaul, J.E. Brown, J.S.M. Peiris, and C.L. Clayton.** 1988. Type II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. *Infect.Immun.* **56**:1158-1161
95. **Smith, H.W., and S. Halls.** 1967. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J.Pathol.Bacteriol.* **93**:499-523
96. **Smith, N.H., P. Beltran, and R.K. Selander.** 1990. Recombination of *Salmonella* phase-I flagellin genes generates new serovars. *J.Bacteriol.* **172**:2209-2216
97. **Smith, N.H., and R.K. Selander.** 1990. Sequence invariance of the antigen-coding central region of the phase 1 flagellar filament gene (*fliC*) among strains of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **172**:603-609
98. **Stordeur P, B. China, G. Charlier, S. Roels, and J. Mainil.** 2000. Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. *Microbes Infect.* **2(1)**:17-24
99. **Suerbaum, S., J.M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N.H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, and M. Achtman.** 1998. Free Recombination within *Helicobacter pylori*, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, Vol. **95**:12619-12624
100. **Sueyoshi, M., and M. Nakazawa.** 1994. Experimental infection of young chicks with attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **62**:4066-4071

101. **Tarr, P.I., L.M. Schoening, Y.L. Yea, T. Ward, and T.S. Whittam.** 1999. Acquisition of the *rfb-gnd* Chromosomal Region in the Divergence of *Escherichia coli* O157:H7. Abstr. B/D-335, p. 95, Abstr. 99<sup>th</sup>-Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1999. American Society for Microbiology, Chicago, Illinois
102. **Tzipori, S.R., T.J. Makin, M.L. Smith, and F.L. Krautil.** 1981. Clinical manifestations of diarrhea in calves infected with rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli*. J.Clin.Microbiol. **8**:35-43
103. **Tzipori, S., H. Karch, K.I. Wachsmuth, R.M. Robins-Browne, A.D. O'Brien, H. Lior, M.L. Cohen, J. Smithers, and M.M. Levine.** 1987. Role of a 60-Megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. Infect.Immun. **55**:3117-3125
104. **Tzipori, S., J. Montanaro, R.M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M.M. Levine.** 1992. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect.Immun. **60**:5302-5306
105. **Weber, A., H. Klie, H. Richter, P. Gallien, M. Timm, and K. W. Perlberg.** 1997. Über die derzeitigen Probleme zum Auffinden von Infektionsquellen und Infektionsketten bei enterohämorrhagischen *E.coli* (EHEC). Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. **110**:211-213
106. **Wei, L.N and T.M. Joys.** 1985. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*. J.Mol.Biol. **186**:791-803
107. **Whittam, T.S., H. Ochman, and R.K. Selander.** 1983. Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. Mol.Biol.Rev. **1**:67-83

108. **Whittam, T.S., H. Ochman, and R.K. Selander.** 1983. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci. USA **80**:1751-1755
109. **Whittam, T.S., I. Kaye Wachsmuth, and R.A. Wilson.** 1988. Genetic Evidence of Clonal Descent of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome, J.Infect.Dis. **157**, No.6, 1124-1133
110. **Whittam, T.S., M.L. Wolfe, I.K. Wachsmuth, F. Ørskov, I. Ørskov, and R.A. Wilson.** 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea, Infect. & Immunity, May, **61(5)**:1619-1629
111. **Whittam, T.S.** 1996. Genetic Variation and Evolutionary Processes in Natural Populations of *Escherichia coli*. In: *E.coli and Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. Ed.: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington DC, pp.2708-2720
112. **Whittam, T.S., and E.A. McGraw.** 1996. Clonal Analysis Of EPEC Serogroups. Rev. Microbiol. **27**:7-16
113. **Whittam, T.S.** 1998. Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin Producing *E.coli* Strains. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin Producing *E.coli* Strains. Ed.: James B. Kaper and Alison D. O'Brien, ASM Press, Washington DC, pp.195-209
114. **Wieler, L.H., R. Bauerfeind, and G. Baljer.** 1992. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhea. Zbl.Bakt. **276**:243-253



115. **Wieler, L.H., E. Vieler, C. Erpenstein, T. Schlapp, H. Steinrück, R. Bauerfeind, A. Byomi, and G. Baljer.** 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J.Clin.Microbiol.* **34**:2980-2984
116. **Wieler, L.H., T.K. McDaniel, T.S. Whittam, and J.B. Kaper.** 1997. Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogenie of the strains. *FEMS Microbiol.Lett.* **156**:49-53
117. **Wieler, L.H.** 1997. Habilitation thesis. Justus-Liebig-Universität Gießen
118. **Wieler, L.H., A. Schwanitz, E. Vieler, B. Busse, H. Steinrück, J.B. Kaper, and G. Baljer.** 1998. Virulence properties of Shiga toxin-producing *E.coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *J.Clin.Microbiol.* **36**:1604-1607
119. **Wiesner, Ekkkehard, and Ribbeck, Regine.** 1991. Wörterbuch der Veterinärmedizin, 3. neu bearbeitete Auflage, Enke Verlag, Stuttgart
120. **World Health Organization.** 1994. World Health Organization report of the working group meeting on Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC), with emphasis on zoonotic aspects. World Health Org., Geneva, Switzerland.

## Danksagung

Wenn ich auf die Zeit meiner Doktorarbeit zurückblicke, fallen mir spontan sehr viele Menschen ein, die zum Gelingen dieser Arbeit viel beigetragen haben. Ich möchte an dieser Stelle allen, die mich in dieser Phase unterstützt haben, meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer für die Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die großzügige Bereitstellung sämtlicher für diese Promotion benötigten Mittel. Darüberhinaus war er durch seine konstruktive Kritik eine wertvolle Hilfe bei der Erstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Ebenso möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. L.H. Wieler für seine stets humorvoll-freundliche Unterstützung danken. Durch ihn wurde mein Interesse an der Wissenschaft geweckt, nicht zuletzt weil er mir jederzeit mit seinem Wissen tatkräftig zur Seite stand. Ich konnte durch meine Mitarbeit in einem seiner von der DFG geförderten Projekte nicht nur meine fachlichen Kenntnisse erweitern sondern auch die Finanzierung meiner Arbeit gewährleisten. Dafür danke ich ihm sehr herzlich.

Gleichzeitig möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Bauerfeind für seine präzise, stets freundlich gewährte Kritik bei der Entstehung dieser Arbeit danken. Durch ihn lernte ich genaues wissenschaftliches Arbeiten.

Frau Anja Schwanitz danke ich für ihre stets geduldige Einführung in molekularbiologische Untersuchungsmethoden, und Frau Stefanie Barth für viele bereichernde Ideen und Gespräche in Bezug auf meine Doktorarbeit.

Bei allen nicht namentlich erwähnten Institutsmitgliedern bedanke ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme, die erwiesene Hilfsbereitschaft sowie das gute Arbeitsklima.

Herrn PD Dr. S. Schwarz und seinen Mitarbeitern, insbesondere Frau Dr. Martina Weide-Botjes gilt mein besonderer Dank für ihr freundlich zur Verfügung gestelltes Wissen bezüglich der Pulsfeldgelelektrophorese. Herrn Dr. Dag Harmsen danke ich für seine Hilfestellung bei der computergestützten Auswertung meiner Arbeit.

Mein großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir durch ihre geistige wie finanzielle Unterstützung nicht nur mein Studium sondern auch diese Promotionsarbeit ermöglicht haben. Ohne ihr großes Verständnis und ihr jederzeit offenes Ohr für die kleinen und großen Schwierigkeiten hätte ich diese nicht so gut bewältigen können.

Besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei meinem Mann Marcus Weniger, der in dieser nicht immer leichten Zeit stets hinter mir gestanden hat. Sein in mich gesetztes Vertrauen hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.