



**LGL**

V. EHEC-Workshop  
2016  
Nördlingen, 8. bis 10. Juni 2016

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

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

Telefon: 09131 6808-0

Telefax: 09131 6808-2102

E-Mail: [poststelle@lgl.bayern.de](mailto:poststelle@lgl.bayern.de)

Internet: [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)

Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Druck: osterchrist druck und medien GmbH, Nürnberg

Stand: Mai 2016

Autoren: Alle Autoren sind namentlich im Manuskript gekennzeichnet

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Regina Konrad

Telefon: 09131 6808-5886

E-Mail: [regina.konrad@lgl.bayern.de](mailto:regina.konrad@lgl.bayern.de)

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit  
alle Rechte vorbehalten

ISBN 978-3-945332-67-2 Druckausgabe  
ISBN 978-3-945332-68-9 Internetausgabe

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Bei publizistischer Verwertung – auch von Teilen – wird um Angabe der Quelle und Übersendung eines Belegexemplars gebeten.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung.

Unter Tel. 089 122220 oder per E-Mail unter [direkt@bayern.de](mailto:direkt@bayern.de) erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Grußwort des LGL- Präsidenten Dr. Andreas Zapf</b> .....	<b>4</b>
<b>Tagungsprogramm</b> .....	<b>6</b>
<b>Einführung, Vorwort</b> .....	<b>14</b>
<b>Festvortrag</b> .....	<b>16</b>
Abstracts – Epidemiologie und Klinik .....	18
Abstracts – Tier und Umwelt .....	25
Abstracts – Diagnostik.....	32
Abstracts – Lebensmittel .....	38
Abstracts – Pathogene <i>E.coli</i> .....	43
Abstracts – Pathogenitätsfaktoren und Genomics.....	48
Abstracts – Poster .....	66
<b>Referenten und Moderatorenverzeichnis</b> .....	<b>99</b>

## **Grußwort des LGL- Präsidenten Dr. Andreas Zapf**



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

EHEC-Infektionen sind auch heute noch – 20 Jahre nach den ersten HUS-Fällen in Bayern und fünf Jahre nach dem bisher größten EHEC-Ausbruch in Deutschland im Frühsommer 2011 – eine große Herausforderung für den Öffentlichen Gesundheitsdienst.

Bereits zum fünften Mal kommen zahlreiche Experten aus der Schweiz, Österreich und Deutschland zusammen, um hier aus Sicht der unterschiedlichen Fachdisziplinen neue Aspekte der Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Human- und Veterinärmedizin, Umwelt, Lebensmittel, Genomics und Pathogenitätsfaktoren zu diskutieren. Nach wie vor besteht beispielsweise eine Herausforderung darin, genügend Isolate für weiterführende molekularepidemiologische Surveillance zu gewinnen, zumal niedergelassene Labore tendenziell immer mehr molekulare Direktnachweise ohne Erregerisolierung verwenden.

Ein effektives Ausbruchsmanagement ist nur möglich, wenn die Erkenntnisse der medizinischen Grundlagenforschung, der Ökologie der EHEC-Erreger sowie der Diagnostik und Epidemiologie interdisziplinär im Sinne eines One Health-Ansatzes zusammengeführt und diskutiert werden. Durch die Vernetzung aller Fachbereiche kann insbesondere der Öffentliche Gesundheitsdienst seine Aufgaben zwischen Öffentlichkeitsarbeit, vorbeugendem Infektionsschutz und Ausbruchsmanagement gestärkt wahrnehmen.

Das LGL veranstaltet den Workshop gemeinsam mit den Fachgruppen „Gastrointestinale Infektionen“, „Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene“ und „Zoonosen“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), der

Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), dem „Österreichischen Referenzzentrum und Referenzlabor für *E. coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli*“ in Graz sowie dem Nationalen Zentrum für enteropathogene Bakterien (NENT) in Zürich.

Ich wünsche uns allen eine fachlich interessante und erfolgreiche Tagung in angenehmer und anregender Atmosphäre.

Ihr

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Zapf', written in a cursive style.

Dr. med. Andreas Zapf  
Präsident des LGL

## Tagungsprogramm

### Mittwoch, 8. Juni 2016

- ab 17<sup>00</sup> Anreise, Anmeldung  
ab 18<sup>30</sup> Begrüßung  
*A. Zapf, Präsident LGL*  
19<sup>00</sup> - 20<sup>00</sup> Festvortrag:  
Komplement und eHUS  
*R. Würzner, Innsbruck*

*Anschließend gemütliches Beisammensein*

### Donnerstag, 9. Juni 2016

#### Epidemiologie

Vorsitz: *A. Sing, K. Stark*

- 9<sup>00</sup> - 9<sup>20</sup> Studien an Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* O26:H11/HNM isoliert in Österreich von 2009-2014  
*S. Schlager et al., Graz*
- 9<sup>20</sup> – 9<sup>40</sup> Schätzung der Inzidenz von Erkrankungen durch Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* O157 und non-O157 in Deutschland  
*K. Stark et al., Berlin*
- 9<sup>40</sup> – 10<sup>00</sup> Ein Ausbruch von Sorbitol-fermentierenden enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O157: H- in 2015 – Sandkastensand als mögliche Infektionsquelle?  
*S. Toikkanen, Hannover*
- 10<sup>00</sup> – 10<sup>15</sup> Diskussion
- 10<sup>15</sup> – 11<sup>00</sup> Kaffeepause + Posterpräsentation

Donnerstag, 9. Juni 2016

## Tier und Umwelt

Vorsitz: R. Bauerfeind

- 11<sup>00</sup> – 11<sup>20</sup> Überblick über das Zoonosen-Monitoring zu Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli* in Deutschland  
*E. Hauser, Berlin*
- 11<sup>20</sup> – 11<sup>40</sup> Vorkommen und Verhalten von EHEC in landwirtschaftlichen Biogasanlagen  
*B. Huber, Freising*
- 11<sup>40</sup> – 12<sup>00</sup> Auf der Spur Pflanzen-assoziiertes STEC: Kontamination oder Habitat?  
*A. Bauwens, Münster*
- 12<sup>00</sup> – 12<sup>15</sup> Diskussion
- 12<sup>15</sup> – 14<sup>00</sup> Mittagspause

## Diagnostik

Vorsitz: A. Fruth

- 14<sup>00</sup> - 14<sup>20</sup> Characterisation of Shiga toxin producing *E. coli* strains using digital PCR after direct emulsification of bacteria  
*M. Peier et al., Zürich*
- 14<sup>20</sup> – 14<sup>40</sup> Solid phase microbead array for multiplex O serotyping of *E. coli*  
*P. Schierack et al., Senftenberg*
- 14<sup>40</sup> – 15<sup>00</sup> Evaluierung eines neu entwickelten ELISA zum Nachweis von enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EPEC und EHEC) durch Erkennung des EspA Proteins  
*L. Beutin et al., Berlin*
- 15<sup>00</sup> – 15<sup>10</sup> Diskussion

**Donnerstag, 9. Juni 2016**

**Lebensmittel**

Vorsitz: *U. Busch, R. Stephan*

**15<sup>10</sup> – 15<sup>30</sup>** Untersuchungen zu Vorkommen, Molekulargenetik und Funktion des Subtilase Zytotoxins Shiga Toxin-produzierender *E. coli* (STEC)

*H. Schmidt, Hohenheim*

**15<sup>30</sup> – 15<sup>50</sup>** EHEC-monitoring in raw milk soft cheese of a Swiss delicatessen

*J. Rentsch et al., Courtepin*

**15.<sup>50</sup> - 16.<sup>00</sup>** Diskussion

**16<sup>00</sup> – 16<sup>30</sup>** Kaffeepause

**Pathogene *E. coli***

Vorsitz: *R. Würzner*

**16<sup>30</sup> - 16<sup>50</sup>** Schädigung von Erythrozyten-Vorläuferzellen durch Shiga Toxin und Neoglykolipide aus Pektinen als Shiga Toxin-Inhibitoren

*J. Müthing et al., Münster*

**16<sup>50</sup> – 17<sup>10</sup>** Funktionale Charakterisierung von Aggregative *Adherence Fimbrien* (AAF) von *Escherichia coli*

*U. Dobrindt, Münster*

**17<sup>10</sup> – 17<sup>20</sup>** Diskussion

**17<sup>20</sup> - 17<sup>40</sup>** Verleihung der Posterpreise

**Ab 20.<sup>00</sup> Uhr Abendprogramm**

Freitag, 10. Juni 2016

## Pathogenitätsfaktoren und Genomics

Vorsitz: *H. Schmidt*

**8<sup>30</sup> - 8<sup>50</sup>** Prophagenkodierte Enzyme von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 ermöglichen die Nutzung von 5-*N*-Acetyl-9-*O*-Acetyl-Neuraminsäure als Kohlenstoffquelle  
*N. Saile, Hohenheim*

**8<sup>50</sup> - 9<sup>10</sup>** Eine neue Perspektive für ein altes Problem: Kernelemente der Replikationskontrolle des ESBL Plasmides pO104\_90 von *Escherichia coli* O104:H4 regulieren auch die Transferfrequenz  
*M. Berger, Münster*

**9<sup>10</sup> - 9<sup>30</sup>** The virulence-associated primary transcriptome of EHEC O104:H4  
*P. Berger, Münster*

**9<sup>30</sup> - 9<sup>45</sup>** Diskussion

**9<sup>45</sup> - 10<sup>15</sup>** Kaffeepause

Vorsitz: *S. Schlager, H. Karch*

**10<sup>15</sup> - 10<sup>35</sup>** Thin-layer chromatography mass spectrometry imaging of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in crude lipid extracts  
*I. Kouzel et al., Münster*

**10<sup>35</sup> - 10<sup>55</sup>** Shiga Toxin Glykosphingolipid-Rezeptoren und ihre Assoziation mit lipid raft-Mikrodomänen in MDCKII Nierenepithelzellen  
*N. Legros et al., Münster*

**10<sup>55</sup> - 11<sup>15</sup>** Biosensor-basierte Echtzeit-Interaktionsanalysen von Shiga Toxinen mit Glykosphingolipid-Rezeptoren in Modellmembranen  
*D. Steil et al., Münster*

**11<sup>15</sup> - 11<sup>30</sup>** Diskussion

Vorsitz: *C. Menge*

**11<sup>30</sup> - 11<sup>50</sup>** *in-vitro* Charakterisierung von Virulenzeigenschaften symptomatischer und asymptomatischer enterohämorrhagischer *Escherichia coli* Isolate der Serogruppe O91  
*J. Putze et al., Münster*

**11<sup>50</sup> - 12<sup>10</sup>** Neoglykolipide pflanzlichen Ursprungs verringern die Zytotoxizität von Shiga Toxinen aus EHEC gegenüber Vero-Zellen  
*D. Rubin et al., Münster*

**12<sup>10</sup> – 12<sup>25</sup>** Diskussion und Abschluss der Tagung

**12<sup>30</sup> - 14<sup>00</sup>** Mittagessen

## Posterpräsentationen

### Epidemiologie und Klinik

Ganzgenomsequenzierung von EHEC O103:H2 – Isolaten aus einer  
Erkrankungshäufung in einer Kindereinrichtung in Erlangen, 2015

*C. Lang et al., Wernigerode*

Netzwerk für Molekulare Surveillance von EHEC-Infektionen in Deutschland

*A. Fruth et al., Wernigerode*

Hemolytic uremic syndrome in a 65 year-old male linked to a very unusual type of  
*stx2e* and *eae* harboring O51:H49 Shiga toxin producing *Escherichia coli*

*D. Fasel et al., Basel*

Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated during  
2010-2015 from human infections in Switzerland

*N. Cernela et al., Zürich*

### Nachweisverfahren und Diagnostik

Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis lebensfähiger EHEC/EPEC

*B. Fröschle et al., Freising*

Optimierte Induktion der Shiga Toxin-Expression in enterohämorrhagischen  
*Escherichia coli*

*T. Guo et al., Münster*

Ringversuch zur Identifizierung von enterotoxischen und enterotoxämischen  
*Escherichia coli* des Schweines

*K. Kerner et al., Gießen*

## **EHEC und Lebensmittel**

Effects of different media on the enrichment of low numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mungo bean sprouts and on the development of the sprout microbiome

*R. H. Margot et al., Zürich*

Studie zur Besiedelung von Bockhornkleesamen und Sprossen mit dem Ausbruchsstamm EHEC O104:H4 (2011)

*I. Huber et al., Oberschleißheim*

## **EHEC in Tier und Umwelt**

Studien an Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) der Serogruppen O27, O91 und O113 aus Human-, Rind-, Schaf- und Wildproben

*S. Neubauer et al., Graz*

*Shiga Toxin*-bildende *Escherichia coli* (STEC) in Faecesproben von Wildschweinen aus Polen

*N. Drees et al., München*

## **Pathogene E. coli**

Genomsequenzierung von zwei neuen EHEC/EAEC Hybrid Stämmen aus menschlichen Infektionen

*C. Lang et al., Wernigerode*

Occurrence of uropathogenic and enteric pathogenic virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans

*M. Nüesch-Inderbinnen et al., Zürich*

## Pathogenitätsfaktoren und Genomics

The accessory genome correlates with the colonization type of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of bovine origin

*S. A. Barth et al., Jena*

Switching the O-antigen gene cluster in *Escherichia coli* – an opportunity for STEC to persist longer in cattle?

*L. Geue et al., Jena*

N-Acylglukosamin-Derivate verändern die Glykosphingolipid-Expression und damit das Repertoire an Shiga Toxin-Rezeptoren von humanen Epithelzellen

*K.-A. Jarosch et al., Münster*

## **Einführung, Vorwort**

Dr. Regina Konrad

Liebe Kolleginnen und Kollegen, sehr geehrte Damen und Herren,  
es ist mir eine große Freude, Sie zum V. EHEC-Workshop begrüßen zu dürfen.  
Nachdem das von vielen wegen seiner besonderen Atmosphäre geschätzte Wildbad  
Kreuth im Voralpenland als Tagungsort leider nicht mehr zur Verfügung steht, freut  
es mich umso mehr, dass Sie sich auch in der ehemals freien Reichsstadt  
Nördlingen zum EHEC-Workshop eingefunden haben. Dies zeigt, dass sich bei den  
vergangenen Workshops die Kontakte zwischen den verschiedenen Fachdisziplinen  
aus Grundlagenforschung, den Referenzlaboren und dem öffentlichen  
Gesundheitsdienst vertieft haben und die Gelegenheit gerne wahrgenommen wird,  
sich mit den Kollegen und Kolleginnen zu treffen und auszutauschen.  
Mit Hilfe der Kolleginnen und Kollegen aus dem wissenschaftlichen  
Organisationskomitee ist es uns gelungen, erneut ein interessantes und vielfältiges  
Programm zusammenzustellen, das alle Aspekte zu EHEC und pathogenen  
*Escherichia coli* abdeckt. Die aktive Beteiligung aller nationalen Referenzzentren aus  
Deutschland – mit dem Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere  
bakterielle Enteritiserreger des Robert Koch-Instituts in Wernigerode, dem  
Nationalen Referenzlabor für *Escherichia coli* des BfR, dem Nationalen  
Konsiliarlabor für HUS der Universität Münster-, aus Österreich mit dem  
Österreichischen Referenzzentrum und Referenzlabor für *E. coli* einschließlich  
Verotoxin bildender *E. coli* in Graz und aus der Schweiz mit dem Nationalen Zentrum  
für enteropathogene Bakterien und Listerien in Zürich trägt wesentlich zum Erfolg  
des Workshops bei. Ihnen und den Fachgruppen „Gastrointestinale Infektionen“,  
„Lebensmittelmikrobiologie und – hygiene“ und „Zoonosen“ der Deutschen  
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie danke ich sehr herzlich.  
Mein besonderer Dank gilt Frau Gallersdörfer, Frau Böttcher und Herrn Janssen von  
der Akademie für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, die sich mit  
außerordentlichem Engagement um die Organisation und Durchführung des  
Workshops gekümmert haben. Ohne ihre Hilfe hätte ich diese Herausforderung nicht

meistern können. Herrn Dr. Busch, dem erprobten Organisator der vorangegangenen vier EHEC-Workshops, und Prof. Sing aus dem Sachgebiet Public Health Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie am LGL danke ich sehr für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Vorbereitung des Workshops. Weiterhin danke ich allen Helfern und Helferinnen, die in irgendeiner Form vor und hinter den Kulissen zum Gelingen der Tagung beigetragen haben, ohne sie wäre eine solche Veranstaltung nicht möglich.

Ich wünsche uns allen einen erfolgreichen und bereichernden Workshop an einem neuen Ort. Ich bin mir sicher, dass auch Nördlingen an der romantischen Straße mit seiner bezaubernden Altstadt und vollständigen Stadtmauer zum Gelingen der diesjährigen Tagung beitragen wird.

## Festvortrag

### Komplement und *Escherichia coli*-induziertes hämolytisch-urämisches Syndrom (eHUS)

*Orth-Höller D. und Würzner R.*

*Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria*

Das *Escherichia coli*-induzierte hämolytisch-urämische Syndrom (eHUS) wurde früher auch als klassisches oder typisches oder Diarrhö assoziiertes (D+ HUS) oder Shigatoxin-produzierende *E. coli*-induziertes (STEC-HUS) oder enterohämorrhagische *E. coli*-induziertes HUS (EHEC-HUS) bezeichnet – als einfachste und korrekteste Abkürzung ist seit kurzem eHUS in Umlauf. Dieses Syndrom ist eine schwere lebensbedrohliche Erkrankung, die mit hämolytischer Anämie, nicht-immuner Thrombozytopenie und Organversagen einhergeht. Als Hauptverursacher wurde eine Infektion des Gastrointestinaltraktes mit Shiga toxin (Stx) produzierenden enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) identifiziert. Es sind aber auch Verläufe mit Stx-negativen *E. coli* beschrieben worden. Das eHUS ist häufig von einer schweren, z.T. blutigen Diarrhö begleitet, die aber auch fehlen kann. Andere HUS-Formen können hingegen auch, wenn auch seltener, mit einer Diarrhö einhergehen. Das Komplementsystem ist eines der wichtigsten angeborenen, humoralen (d.h. nicht zellulären) Immunabwehrsysteme des Menschen. Angeborene (vor allem Mutationen) oder erworbene (meist Antikörper gegen das Komplementkontrollprotein Faktor H) Störungen wurden noch Ende des letzten Jahrtausends als ursächlich für ein sogenanntes „atypisches“ hämolytisch-urämisches Syndrom (aHUS) identifiziert. In der letzten Dekade mehrten sich die Evidenzen, dass Komplement auch beim eHUS eine bedeutende Rolle spielen könnte. Erhöhte Konzentrationen von aktivierten Komplementfaktoren wurden schon früher beim eHUS gemessen, aber erst 2009 wurde publiziert, dass Stx 2 (eines der beiden wichtigsten Shigatoxine) Komplement aktivieren und an das wichtigste Komplementkontrollprotein Faktor H binden kann, was in einer Reduktion seiner Schutzfunktion resultiert. Der Ausfall dieser Kontrolle und die daraus folgende überschießende Reaktion fördert dann die

durch Shigatoxin-vermittelte Zerstörung der Niere. Daher wurde seinerzeit schon postuliert, dass eine Inhibition des Komplementsystems zu einem günstigen Verlauf des eHUS beitragen könnte.

Diese Ergebnisse wurden von derselben aber auch anderen Arbeitsgruppen bestätigt und mit anderen Modellen erweitert, allerdings jeweils nur *in vitro*. Alle diese Arbeiten haben Lapeyraque und Kollegen animiert, einen lizenzierten, kommerziellen Komplementinhibitor (von dem Prototypen bereits 1990 in Göttingen beschrieben wurden) in der Therapie dreier dreijähriger schwerkranker Knaben einzusetzen, die daraufhin alle gesundeten. Die Publikation dieser Forschungsergebnisse wurde vom New England Journal of Medicine ein paar Wochen vorgezogen, weil zu dieser Zeit (2011) gerade der EHEC O104:H4 Ausbruch in Norddeutschland grassierte. Die Umsetzung der *in vitro* Daten in die Therapie war dann für viele behandelnde Ärzte der entscheidende Stimulus auch ihre Patienten zu behandeln.

Ein abschließendes Urteil über die klinische Wirksamkeit einer Komplementinhibition werden hoffentlich zwei laufende kontrollierte Studien in Frankreich und England zeigen. Die bisherige Datenlage suggeriert, dass Komplement beim eHUS wohl eine – wenn auch nicht dominante - Rolle spielt und eine Inhibition dessen bei einem schweren eHUS den Unterschied zwischen Leben und Tod ausmachen könnte.

# A

## Abstracts – Epidemiologie und Klinik

- I. Studien an Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* O26:H11/HNM isoliert in Österreich von 2009-2014  
*S. Schlager et al., Graz*
  
- II. Schätzung der Inzidenz von Erkrankungen durch Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* O157 und non-O157 in Deutschland  
*K. Stark et al., Berlin*
  
- III. Ein Ausbruch von Sorbitol-fermentierenden enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O157: H- in 2015 – Sandkastensand als mögliche Infektionsquelle?  
*S. Toikkanen, Hannover*

## I.

### Studien an Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* O26:H11/HNM isoliert in Österreich von 2009-2014

Sabine Schlager<sup>1</sup>, Nadine Hiden<sup>1</sup>, Werner Ruppitsch<sup>2</sup>, Burkhard Springer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nationale Referenzzentrale und Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin – bildender *E. coli*, Österreichische Agentur für Gesundheit-und Ernährungssicherheit (AGES)), Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Beethovenstraße 6, A-8010 Graz  
<sup>2</sup>AGES, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Währingerstraße 25a, A-1096 Wien

**Schlüsselwörter:** VTEC O26:H11/HNM, MLST, ST29, Epidemiologie

**Keywords:** VTEC O26:H11/HNM, MLST, ST29, epidemiology

**Einleitung:** Europaweit wird der Anstieg des Sequenztyps 29 (ST29) bei VTEC O26:H11/HNM beobachtet [1]. Um die Frage zu beantworten, in welchem Ausmaß Österreich davon betroffen ist wurden alle VTEC O26:H11/HNM-Isolate, die im Zeitraum von 2009 bis 2014 in der Nationalen Referenzzentrale und im Nationalen Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin-bildender *E. coli* isoliert wurden, untersucht.

**Material und Methoden:** Insgesamt wurden 109 VTEC O26:H11/HNM-Isolate einer Genom-Sequenzierung unterzogen (MiSeq, Illumina Inc.). Neunundachtzig dieser Isolate waren humanen Ursprungs (2010-2014), vier wurden aus Lebensmitteln, 14 aus Rinder- und zwei aus Schafkotproben isoliert. Die Auswertungen wurden mit Ridom SeqSphere (Ridom GmbH) und den Webtools des Centers for Genomic Epidemiology ([www.genomicepidemiology.org](http://www.genomicepidemiology.org)) durchgeführt.

**Ergebnisse und Diskussion:** 11/89 humanen VTEC O26:H11/HNM waren vom ST29 (12,36%). Die restlichen waren vom ST21 (n=76), ST591 (n=1) und ST1566 (n=1). Betrachtet man nur die 32 *stx1-/stx2a+* Stämme, so waren alle elf ST29-Isolate (34,38%) in dieser Gruppe zu finden. Bei 10/32 *stx1-/stx2a+* VTEC O26:H11/HNM-Fällen trat ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) auf. In acht Fällen war das HUS bedingt durch ST21 und nur in zwei Fällen durch ST29. Die restlichen zwei HUS-Fälle, die unter den 89 humanen VTEC O26:H11/HNM-Fällen auftraten, waren bedingt durch außergewöhnliche *stx2f+* VTEC O26:H11 und *stx1a+/stx2-* VTEC O26:HNM.

Das Vorkommen des ST29 konzentrierte sich eher auf den Westen Österreichs: (Vorarlberg (n=1), Tirol (n=5), Salzburg (n=2), Kärnten (n=2), Niederösterreich (n=1)). *Stx*-negative *E. coli* O26:H11 des Sequenztyps 29 konnten aus einem Tiroler Rind isoliert werden. Dieses Isolat war sowohl in der Pulsfeld-Gelelektrophorese als auch in der minimum spanning tree-Analyse in einem Cluster zusammen mit allen humanen VTEC O26:H11/HNM ST29 zu finden.

[1] Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Köck R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Höller D, Marejkova M, Morabito S, Caprioli A, Pierard D, Smith G, Jenkins C, Curova K, Karch H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: A new virulent clone emerges in Europe. 2013; 56: 1373-1381

## II.

### Schätzung der Inzidenz von Erkrankungen durch Shiga Toxinproduzierende *Escherichia coli* O157 und non-O157 in Deutschland

Anna Kühne<sup>1</sup>, Martijn Bouwknegt<sup>2</sup>, Arie Havelaar<sup>2,3</sup>, Andreas Gilsdorf<sup>1</sup>, Klaus Stark<sup>1</sup>,  
Dirk Werber<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Abteilung für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut, Berlin

<sup>2</sup>Centre for Infectious Disease Control, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands

<sup>3</sup>Emerging Pathogens Institute and Animal Sciences Department, University of Florida, Gainesville, USA

<sup>4</sup>Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin

**Schlüsselwörter:** STEC O157, STEC non-O157, HUS, Inzidenz, Modellierung

In der Routinesurveillance wird die Inzidenz der Erkrankungen durch Shiga Toxinproduzierende *Escherichia coli* (STEC) unterschätzt, insbesondere diejenige durch non-O157 STEC. Dies liegt unter anderem an der komplexen und zu wenig genutzten Diagnostik. Wir schätzten die tatsächliche Inzidenz der STEC-Gastroenteritis (STEC-GE) und des STEC-bedingten Hämolytisch-Urämischen Syndroms (HUS) in Deutschland, um diagnostische und Surveillance-Strategien abzuleiten. Auf der Basis der nationalen HUS Meldedaten (2008-2012, außer 2011) haben wir die Inzidenz der STEC-bedingten Erkrankungen (als mediane jährliche Inzidenz pro 100.000 Einwohner) modelliert. Dabei wurde die unterschiedliche Wahrscheinlichkeit der verschiedenen Serogruppen eine blutige Diarrhoe und ein HUS auszulösen berücksichtigt. Medline und Scopus wurden nach Studien durchsucht, die diese spezifische Information für Deutschland enthielten. Die Unsicherheit bezüglich der in das Modell aufgenommenen Parameter wurde mittels stochastischer Simulationen evaluiert (@RISK Version 6.1.1).

Wir identifizierten fünf relevante Publikationen, die Informationen zu allen notwendigen Parametern lieferten. Diese Publikationen, die nationalen Meldedaten und deutsche Empfehlungen zur Labordiagnostik bildeten die Grundlage des Simulationsmodells. Die mediane jährliche Inzidenz des STEC-assoziierten HUS wurde auf 0,11 geschätzt (95% KI 0,08-0,20), die Inzidenz der STEC-GE auf 34,6 (95% KI 12-145). Die Meldedaten in Deutschland unterschätzten damit die Inzidenzen des

STEC-assoziierten HUS und der STEC-GE um die Faktoren 1,8 bzw. 32,3. STEC non-O157 machten 78% aller STEC-GE aus, 51% aller STEC-assoziierten blutigen Diarrhoen und 32% aller STEC-assoziierten HUS-Fälle.

Der Anteil von HUS unter den laborbestätigten STEC non-O157 Fällen hatte den stärksten Einfluss auf die Schätzungen.

Die non-O157 Serogruppen dominieren die Inzidenz der STEC-GE und bilden einen signifikanten Anteil des STEC-assoziierten HUS in Deutschland. Dies gilt wahrscheinlich auch für viele andere europäische Länder.

STEC non-O157 sollten genauso wie STEC O157 in der ätiologischen Diagnostik bei Patienten mit GE oder HUS und in modernen STEC-Surveillancesystemen berücksichtigt werden.

Korrespondenz: Klaus Stark, starkk@rki.de, Abt. für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut, Seestr. 10, 13353 Berlin

### III.

## Ein Ausbruch von Sorbitol-fermentierenden enterohämorrhagischen *Escherichia coli* O157: H- in 2015 – Sandkastensand als mögliche Infektionsquelle?

Salla Toikkanen ([salla.toikkanen@nlga.niedersachsen.de](mailto:salla.toikkanen@nlga.niedersachsen.de))<sup>1,2</sup>, Anne Mazick<sup>3</sup>, Katja Claußen<sup>1</sup>, Angelika Fruth<sup>4</sup>, Rita Prager<sup>4</sup>, Antje Flieger<sup>4</sup>, Ute Messelhäuser<sup>5</sup>, Regina Konrad<sup>5</sup>, Johannes Dreesman<sup>1</sup>, Elke Mertens<sup>1</sup>, Martina Scharlach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Hannover, Deutschland

<sup>2</sup>European Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET), European Centre for Disease Prevention and Control, (ECDC), Stockholm, Sweden

<sup>3</sup>Gesundheitsamt Cuxhaven, Cuxhaven, Deutschland

<sup>4</sup>Robert Koch-Institut, Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Wernigerode, Deutschland

<sup>5</sup>Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

**Schlüsselwörter:** HUS, Umweltexposition, Retrospektive Kohortenstudie

**Hintergrund:** Mit Symptombeginn am 6.7.2015 erkrankten im Landkreis Cuxhaven nach einem Wochenende mit gemeinsamen nachbarschaftlichen Aktivitäten drei Kinder <2 Jahren am hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische *Escherichia coli* (SF EHEC) O157:H- wurden aus Stuhlproben isoliert. Wir führten eine Ausbruchsuntersuchung durch, um das Ausmaß und die Quelle des Ausbruchs zu identifizieren und weitere Infektionen zu verhindern.

**Methoden:** Aktive Fallsuche und retrospektive Kohortenstudie führten wir bei den Mitgliedern der beiden Familien durch, die an den gemeinsamen Aktivitäten am 3.-5.7. teilnahmen. Ein Fall war eine Person mit Nachweis von SF EHEC O157:H- in der ersten Stuhlprobe. Wir sammelten Informationen über Symptome, Wasser- und Lebensmittelexpositionen sowie Outdoor-Aktivitäten und berechneten relative Risiken (RR) mit 95% Konfidenzintervallen (KI). Stuhlproben von Fällen und Kontakten, Lebensmittel-, Wasser- und Umweltproben wurden mikrobiologisch untersucht und die Isolate mit Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) typisiert.

**Ergebnisse:** Sechzehn Personen wurden in die Studie eingeschlossen. Sechs Kinder erfüllten die Falldefinition: drei HUS-Patienten und drei asymptomatische

Ausscheider; alle Isolate hatten identische PFGE-Muster. Zwei weitere mögliche Sekundärfälle wurden identifiziert. In der univariaten Analyse waren Spielen im Sandkasten (RR 7.0, 95%KI 1.0-47) und Verzehr von Bananen (RR 6.0, 95%KI 1.0-36) mit dem Nachweis von SF EHEC O157:H- assoziiert. Eine Sandkastenprobe war positiv für SF EHEC O157:H- mit 98% identischem PFGE-Muster.

**Diskussion und Empfehlungen:** Umweltquellen für SF EHEC O157:H- Infektionen werden in der Literatur diskutiert, hier wurde zum ersten Mal der Erreger in humanen und in Umweltproben nachgewiesen. Dennoch bleibt unklar, wie und wann es zu einer Kontamination des Sandes kam. Wir empfehlen die routinemäßige mikrobiologische Typisierung von gemeldeten EHEC/HUS Fällen. Bei Fällen mit SF EHEC O157:H- sollten zusätzlich Umweltproben untersucht werden, um mehr über Transmissionsrouten und geeignete Präventivmaßnahmen zu erfahren.

# B

## Abstracts – Tier und Umwelt

- I. Überblick über das Zoonose-Monitoring zu Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli* in Deutschland  
*E. Hauser, Berlin*
- II. Vorkommen und Verhalten von EHEC in landwirtschaftlichen Biogasanlagen  
*B. Huber, Freising*
- III. Auf der Spur Pflanzen-assoziiertes STEC: Kontamination oder Habitat?  
*A. Bauwens, Münster*

## I.

# Überblick über das Zoonosen-Monitoring zu Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli* in Deutschland

*Elisabeth Hauser*

Bundesinstitut für Risikobewertung, Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin-bildende *E. coli*, Standort Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, E-Mail: [elisabeth.hauser@bfr.bund.de](mailto:elisabeth.hauser@bfr.bund.de)

**Schlüsselwörter:** STEC, Zoonosen, Lebensmittelkette, Prävalenz

**Keywords:** STEC, zoonoses, food chain, prevalence

Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) gehören zu den Zoonoseerregern mit einem Reservoir in Wiederkäuern wie Rind, Schaf und Ziege, werden aber auch zunehmend in Wildwiederkäuern nachgewiesen. Als Hauptursache von lebensmittelbedingten STEC-Infektionen des Menschen gelten Lebensmittel von Nutz- und Wildtieren, in zunehmendem Maß aber auch pflanzliche Lebensmittel. Die Überwachung dieses Erregers und anderer wichtiger Zoonoseerreger basiert auf der Richtlinie 2003/99/EG und wird in Deutschland im Zoonosen-Monitoring umgesetzt. Dieses Programm hat das Ziel einen repräsentativen Überblick über die vorherrschenden Zoonosen zu erhalten.

In einem Stichprobenplan werden die zu überwachenden Tierpopulationen, die zu überwachenden Stufen der Lebensmittelkette, die Anzahl der zu untersuchenden Proben sowie die Probenahme- und Analyseverfahren festgelegt. Seit 2009 werden jährlich repräsentative Proben verschiedener Matrices, verteilt über die Lebensmittelkette, vom Erzeuger bis zum Einzelhandel, genommen und analysiert. Für STEC wurden im Jahr 2013 die Matrices Mastrinder (Kot, Dickdarminhalt, Schlachtkörper und Frischfleisch) sowie frische Erdbeeren vom Erzeuger und aus dem Einzelhandel untersucht. Im Jahr 2014 standen Rohmilchkäse, Sammelmilchproben vom Rind aus konventioneller und ökologischer Haltung sowie frische Kräuter im Fokus während 2015 Rohmilch von kleinen Wiederkäuern und Käse, Blinddarminhalt von Mastkälbern, Rindfleisch aus dem Groß- und Einzelhandel

sowie verpackte vorgeschnittene Blattsalate beprobt wurden [1,3]. So konnten z.B. 2013 aus insgesamt 2174 Proben 118 Isolate gewonnen werden. Diese entstammten alle der Lebensmittelkette Rindfleisch und bedeuten STEC in 22,8 % der Mastrindkotproben, in 11,0 % des Dickdarminhalts, in 2,5 % der Schlachtkörper und 2,0 % des frischen Rindfleischs. Die erhaltenen Stämme gehörten 37 verschiedenen O-Gruppen an und zeigten Shiga Toxin-kodierende Gene in 45,7 % (*stx1*) und 81,0 % (*stx2*) der Fälle bzw. eine Kombination beider Gene. Die Zoonose-Monitoring Daten werden genutzt um die Prävalenz und das Gefährdungspotential der Erreger in spezifischen Matrices unterschiedlicher Stufen der Lebensmittelkette abzuschätzen.

[1] BVL (2015): Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2013 – Zoonosen-Monitoring 2013.

[http://www.bvl.bund.de/DE/01\\_Lebensmittel/01\\_Aufgaben/02\\_AmtlicheLebensmittelueberwachung/08\\_ZoonosenMonitoring/lm\\_zoonosen\\_monitoring\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/08_ZoonosenMonitoring/lm_zoonosen_monitoring_node.html)

[2] BVL (2016): Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2014 – Zoonosen-Monitoring 2014.

[http://www.bvl.bund.de/DE/01\\_Lebensmittel/01\\_Aufgaben/02\\_AmtlicheLebensmittelueberwachung/08\\_ZoonosenMonitoring/lm\\_zoonosen\\_monitoring\\_node.html](http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/08_ZoonosenMonitoring/lm_zoonosen_monitoring_node.html)

## II.

### Vorkommen und Verhalten von EHEC in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

*Bianca Fröschle, Bettina Huber, Isabella Kinker, Ute Messelhäuser, Michael Lebuhn*

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung für Qualitätssicherung und  
Untersuchungswesen, Lange Point 6, 85354 Freising

**Schlüsselwörter:** Biogasanlage, EHEC, Keimreduktion, Krankheitserreger

**Keywords:** biogas plant, EHEC, germ reduction, pathogens

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) können im Darm von Menschen und Tieren (z.B. Wiederkäuern) oftmals ohne Krankheitssymptome auftreten. EHEC gelangen vor allem über tierische Substrate (z.B. Gülle) in Biogasanlagen. Über das Ausbringen des Gärprodukts auf landwirtschaftliche Flächen könnte auch ein Risiko für den Menschen bestehen. Bis dato gibt es nur wenige Daten bezüglich des Vorkommens und des Verhaltens von EHEC in Biogasanlagen. Daher wurden im Rahmen eines Verbundvorhabens der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) und des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) ausgewählte Praxisbiogasanlagen auf die Anwesenheit von EHEC untersucht. Der Nachweis der Keime erfolgte mithilfe selektiver Kultivierung und molekularbiologischer Methoden (Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* Genen). Des Weiteren wurden Keimträgerversuche mit einem EHEC-Vertreter ohne Toxingene (EPEC) in Laborfermentern (30 l) durchgeführt, um die Überdauerungsfähigkeit des Bakteriums in mesophilen (38°C) und thermophilen (55°C) Biogasprozessen zu ermitteln.

Die Bestimmung der Keimzahl vor und nach Exposition in den Laborfermentern erfolgte mithilfe des Most-Probable-Number (MPN)-Verfahrens. Die Untersuchung von insgesamt 134 Proben aus verschiedenen Biogasanlagen ergab eine EHEC Nachweisrate von 29,1%. Dabei waren pflanzliche Substrate mit einer Nachweisrate von 8,3% weniger betroffen als tierische Substrate (52,9%). Bei Fermenterinhalt und Materialien aus nachgeschalteten Prozessstufen lag die Nachweisrate bei 42,1%

bzw. 32,3%. Die Ergebnisse der Keimträgerversuche zeigten, dass EPEC sowohl unter mesophilen (KT 38) und noch wesentlich intensiver unter thermophilen (KT 55) Prozessbedingungen reduziert werden (Abb. 1). In unterschiedlichen mesophilen Biogasprozessen wurde innerhalb von  $23 \pm 1$  h eine Keimreduktion um zwei bis sechs Zehnerpotenzen beobachtet (97,6 bis 99,9999%). Bei thermophiler Prozessführung konnten bereits nach 30 Minuten keine lebensfähigen EPEC mehr nachgewiesen werden. Den Ergebnissen zufolge kann ein Eintrag von EHEC-Bakterien in landwirtschaftliche Biogasanlagen insbesondere durch tierische Substrate stattfinden. Die Keimträgerversuche zeigten aber, dass die Erreger temperaturabhängig (sehr) schnell absterben. Von den Gärprodukten geht demnach ein geringeres Infektionsrisiko aus als von den Einsatzstoffen.

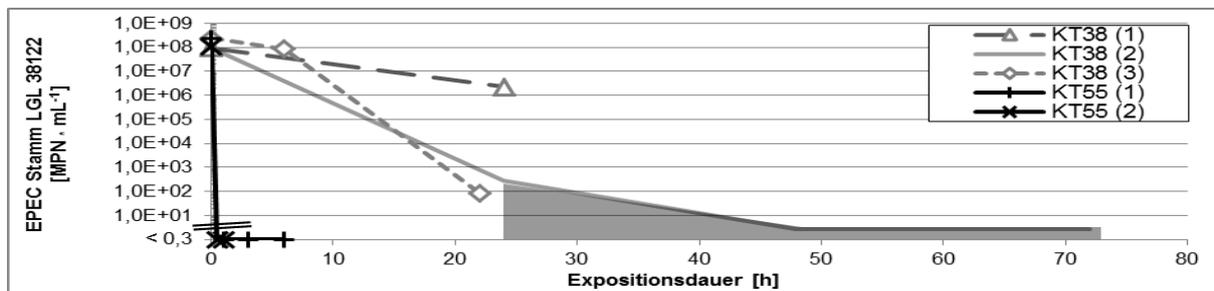


Abb. 1. Keimträgerversuche mit EPEC unter meso- und thermophilen Bedingungen.

### III.

## Auf der Spur Pflanzen-assoziiertes STEC: Kontamination oder Habitat?

*Andreas Bauwens, Francisco Toval, Alexander Mellmann, Helge Karch*

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster  
E-Mail: andreas.bauwens@ukmuenster.de

**Schlüsselwörter:** Sequenzierung, Epidemiologie, Genomik, Reservoir

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sind eine Subgruppe der Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC). Es sind zoonotische Pathogene, die große wasser- oder lebensmittelassoziierte Ausbrüche verursachen können. Obwohl Wiederkäuer als Hauptreservoir dieser Bakterien anerkannt sind, wurden bei der Ursachenforschung mehrerer großer Ausbrüche - inklusive dem jüngsten O104:H4 Ausbruch - pflanzliche Quellen identifiziert. In dieser Studie haben wir uns der Frage gewidmet, ob und inwiefern sich die Pflanzenisolate von anderen aus Klinik, Tier und Umwelt genetisch unterscheiden. Dazu wurde eine projektspezifische Stammsammlung angelegt, die 165 Stämme verschiedener Ursprünge beinhaltet (16 Tier, 32 Umwelt, 31 Pflanze, 86 Mensch). All diese wurden Gesamtgenomsequenziert, *in silico* MLST-sequenztypisiert und darüber hinaus mittels eines Gen-für-Gen Ansatzes auf Basis der Allele das sog. Kerngenom(cg)-MLST durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Stämme einer multilocus variable-number tandem repeat Analyse (MLVA) basierend auf 10 Genregionen unterzogen.

Unserem Wissen nach wurde die größte europäische Sammlung von Pflanzen-assoziierten STEC zusammengetragen. Die Analyse der Stämme mit Methoden verschiedener Diskriminierungsstärke zeigte, dass die Pflanzen-assoziierten Stämme im resultierenden minimal spanning tree nicht clustern, sondern eine sehr hohe Heterogenität aufweisen. Selbst eine Herkunfts-spezifische Häufung der über 5000 mittels cgMLST analysierten Allelen konnte nicht beobachtet werden.

Weiterhin wurden die Sequenzdaten mit anderen, bekannt Pflanzen-kolonisierenden Bakterien verglichen: Es konnte keine Aufnahme von spezifischem Genmaterial nachgewiesen werden. Den Ergebnissen dieser Studie folgend muss

schlussgefolgert werden, dass keine Pflanzen-spezifischen STEC existieren. Die Stämme können in bzw. auf Pflanzen überleben, besitzen jedoch keine besonderen genetischen Charakteristika. Daher ist bei Isolaten aus Lebensmitteln zunächst davon auszugehen, dass es sich um Kontaminationen handelt. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Stammsammlung nur eine limitierte Anzahl von Pflanzenisolaten beinhaltet und dass es Populationen geben kann, die durch exzessive Beprobung gefunden werden könnten.



## Abstracts – Diagnostik

- I. Characterisation of Shiga toxin producing *E. coli* strains using digital PCR after direct emulsification of bacteria  
*M. Peier et al., Zürich*
  
- II. Solid phase microbead array for multiplex O serotyping of *E. coli*  
*P. Schierack et al., Senftenberg*
  
- III. Evaluierung eines neu entwickelten ELISA zum Nachweis von enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EPEC und EHEC) durch Erkennung des EspA Proteins  
*L. Beutin et al., Berlin*

## I.

### Characterisation of Shiga toxin producing *E. coli* strains using digital PCR after direct emulsification of bacteria

René Köppel<sup>1\*</sup>, Thomas Bucher<sup>1</sup>, Martin Peier<sup>1</sup>

\*Author for correspondence: phone: +41 43 244 72 24; e-mail: [rene.koeppel@klzh.ch](mailto:rene.koeppel@klzh.ch)

<sup>1</sup>Official Food Control Authority of the Canton Zürich, Zürich Switzerland

**Keywords:** Droplet digital PCR, EHEC, bacteria, emulsifying

Enterohemorrhagic *E. coli* strains (EHEC) and other Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) strains contain different sets of toxin genes (e.g. *stx1*, *stx2* and *eae*) [1, 2]. Several severe epidemic outbreaks highlighted the danger of these pathogenic bacteria in the past. Therefore, detecting such strains is an important issue of food control. PCR is a useful tool to screen food products for pathogenic bacteria. Analyses by PCR of populations of bacteria can determine the abundance of these toxin genes. However the entity of the single bacteria is lost during DNA isolation and, in the case of a *stx1/stx2/eae* positive result, the following analysis do not show, if some bacteria contain all three genes or if the sample is composed of different strains each containing possibly only one of the genes. This applies particularly to the exchangeable plasmids, which often contain the coding sequences of these toxin genes. To assay these, usually single clones have to be generated followed by molecular biological subtyping to get the information.

Digital PCR (dPCR) is already known for some years [3]. Recently, affordable equipment with easy handling became available to more laboratories. The droplet digital PCR (ddPCR) provided by BioRad generates partitions by emulsifying the PCR-reaction-mix in oil. An individual PCR reaction takes place and is analysed individually in every single of the 10,000- 20,000 droplets.

Here we tested the feasibility of emulsifying bacteria suspensions directly into droplets with the goal that one droplet harbours one bacteria. If the integrity of the bacterial membrane is not lost during emulsification, packaging of whole bacteria allows to maintain the link between toxin harbouring plasmids and the bacterial genome. In this way, one should be able to differentiate mixed populations from

homogenous populations. Since every droplet acts as a separate PCR vessel, combinations of toxin genes can be scanned for all droplets individually when applying multiplex PCR. This system allows to test a number of bacteria, which is much higher compared to the classical clone separation. This should expand the ability to detect a minor but pathogenic population. Here we test the application of direct emulsified bacteria for digital PCR using the QX200 system from BioRad in combination with a duplex ddPCR system for *E. coli* and intimin/eaec.

[1] Sharma V. K. (2002); Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of food Protection*, Volume 65, Number 9, pp. 1371-1380.

[2] Ibekwe A. M., Watt P. M., Grieve C. M., Sharma V. K., Lyons S. R. (2002); Multiplex fluorogenic Real-Time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 10, p. 4853-4862.

[3] Ottesen E. A., Hong J. W., Quake S. R., Leadbetter J. R. (2006); Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria, *Vol 314*, No. 1, p. 1464-1467.

## II.

### **Solid phase microbead array for multiplex O-serotyping of *E. coli***

*Claudia Liebsch*<sup>1</sup>, *Werner Lehmann*<sup>2</sup>, *Uwe Schedler*<sup>3</sup>, *Stefan Rödiger*<sup>1</sup>, *Dirk Roggenbuck*<sup>4</sup>, *Angelika Fruth*<sup>5</sup>, *Peter Schierack*<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>BTU Cottbus-Senftenberg, Senftenberg, Germany, <sup>2</sup>Attomol GmbH, Lipten, Germany, <sup>3</sup>PolyAn GmbH, Berlin, Germany, <sup>4</sup>GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Germany, <sup>5</sup>Robert Koch-Institut, Wernigerode, Germany

**Keywords:** *Escherichia (E.) coli*, serotyping, O-antigen, microbeads, multiplex

O-Serotyping of *Escherichia coli* (*E. coli*) is complex concerning the presence of 184 O-antigens. Agglutination tests employing anti *E. coli* polyclonal antiserum or antibody coated latex particles are the main diagnostic tools in the laboratory. Employing this approach, visible antigen-antibody complexes are formed which allow ready determination by the eye. A major drawback of this procedure is the fact that bacteria can be analysed with regard to only one antiserum / antibody at a time and only a single O-antigen can be identified in each sample. Here we present a proof of concept of a solid phase microbead array for a multiplex O-serotyping in *E. coli*. As representative candidates, ten clinically relevant *E. coli* serotypes that are associated with disease in humans were examined (O26, O55, O78, O118, O124, O127, O128, O142, O145 and O157). Automated image processing and data analysis were conducted by the microscopic platform VideoScan.

Homogenous coupling of antibodies to the microbead surface was demonstrated by an intra-population coefficient of variation (CV) ranging from 3.3 % to 6.3 % and an inter-population CV of 9.5 %. Fluorescence signal intensities indicated that *E. coli* of a certain serogroup bind significantly ( $p < 0.001$ ) to microbeads with the matching antiserum. In summary, we established a new diagnostic tool for an automated multiplex serotyping of *E. coli* that enables us to screen simultaneously for ten different O-antigens in a high throughput manner with a simple staining and binding protocol.

[1]Corresponding author: Institut für Biotechnologie, BTU Cottbus-Senftenberg, Großenhainer Str. 57, D-01968 Senftenberg, Germany. Tel: 0049-3573-85932; Fax: 0049-3573-85809

E-mail: Peter.Schierack@B-TU.de

### III.

## **Evalierung eines neu entwickelten ELISA zum Nachweis von enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EPEC und EHEC) durch Erkennung der EspA Proteins**

*PD Dr. Lothar Beutin, c/o AG Prof. R. Mutzel, Institut für Biologie - Mikrobiologie, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Str. 12-16, 14195 Berlin.*

**Schlüsselwörter:** ELISA, EspA, EPEC, EHEC, *Escherichia albertii*

Ein neu entwickelter ELISA (*RIDASCREEN<sup>®</sup>EPEC*) zum Nachweis des *espA* Genprodukts als Teil der *attaching and effacing* (A/E)-Funktion, die bei EPEC und EHEC, sowie bei Stämmen von *Escherichia albertii* als wichtiges Virulenzmerkmal vorliegt, wurde mit 43 Stämmen von *E. coli* und zwei Stämmen von *E. albertii* mit verschiedenen Kultivierungsmedien auf seine Leistungsfähigkeit geprüft. EspA ist ein filamentöses Protein, das eine wichtige Funktion beim Transport von Effektoren wie Tir vom Bakterium in die Zielzelle spielt. Für EspA wurden fünf genetische Varianten beschrieben, die sämtlich mit dem *RIDASCREEN<sup>®</sup>EPEC* nachweisbar sind [1]. Sechsdreißig der 45 Stämme, darunter beide *E. albertii* Isolate, trugen das Gen für Intimin (*eae*) als Marker für die A/E-Funktion, neun Stämme waren *eae*-negativ. Nach Anzucht in dem für den *RIDASCREEN<sup>®</sup>EPEC* konzipiertem A/E-Medium [1] konnten 34 der 36 *eae*-positiven Stämme im ELISA erkannt werden. Dazu gehörten sowohl typische und atypische EPEC, als auch klassische EHEC-Stämme. Zwei *eae*-positive Stämme (ein *E. coli* und ein *E. albertii*) reagierten im ELISA negativ, wie auch die neun *eae*-negativen Kontrollstämme.

Die Aussagekraft des *RIDASCREEN<sup>®</sup>EPEC* wird entscheidend durch die Zusammensetzung des Kulturmediums bestimmt. Der Zusatz von NaHCO<sub>3</sub> zum A/E-Kultivierungsmedium ist erforderlich, um A/E positive Bakterien sicher im ELISA anzeigen zu können. A/E-Medium ohne Zusatz von NaHCO<sub>3</sub>, sowie alle anderen getesteten Medien mit oder ohne NaHCO<sub>3</sub> Supplementierung erwiesen sich für diesen Zweck als weniger (D-MEM) bis gar nicht brauchbar (mTSB-M).

Der *RIDASCREEN<sup>®</sup>EPEC* stellt eine fundamentale Verbesserung der Diagnostik von EPEC als Verursacher von Gastroenteritiden bei Säuglingen und Kleinkindern dar.

Die in der Routinediagnostik durchgeführte EPEC-Diagnostik beruht auf Bakterienagglutination mit Kaninchenantisera gegen sogenannte klassische EPEC O-Gruppen. Mit diesem Vorgehen werden jedoch nicht alle EPEC erfasst und nur 25% der in der Agglutination positiven Befunde werden als EPEC bestätigt [2].

Dagegen erwies sich *RIDASCREEN®EPEC* als leistungsfähig, um auch aus Mischkulturen (Stuhlproben) EPEC anzeigen zu können.

Auch für die Differenzierung der in klinischen und Lebensmittelproben häufig vorkommenden Shiga toxin produzierenden *E. coli* (STEC) ermöglicht der Einsatz des *RIDASCREEN®EPEC* in Kombination mit dem Verotoxin-Nachweis (VT-ELISA) die schnelle Erkennung von EHEC als Verursacher von blutigem Durchfall und hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) bei Menschen.

1. Praekelt U et al. Monoclonal antibodies against all known variants of EspA: development of a simple diagnostic test for enteropathogenic *Escherichia coli* based on a key virulence factor. J Med Microbiol 2014; 63: 1595-1607.
2. Kozub-Witkowski E et al. Serotypes and virotypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. J Appl Microbiol. 2008;104:403-10.



## **Abstracts – Lebensmittel**

- I. Untersuchungen zu Vorkommen, Molekulargenetik und Funktion des Subtilase Zytotoxins Shiga Toxin-produzierender *E. coli* (STEC)  
*H. Schmidt, Hohenheim*
  
- II. EHEC-monitoring in raw milk soft cheese of a Swiss delicatessen  
*J. Rentsch et al., Courtepin*

## I.

### Untersuchungen zu Vorkommen, Molekulargenetik und Funktion des Subtilase Zytotoxins Shiga Toxin-produzierender *E. coli* (STEC)

*Funk, Joschua*<sup>1</sup>; *Biber, Nadja*<sup>2</sup>; *Hauser, Elisabeth*<sup>1</sup>; *Brüderle, Matthias*<sup>1</sup>; *Reich, Carolin*<sup>1</sup>;  
*Barth, Holger*<sup>2</sup>; *Stephan, Roger*<sup>3</sup>; *Schmidt, Herbert*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Lebensmittelmikro-biologie und -hygiene, Universität Hohenheim, Garbenstraße 28, 70599 Stuttgart, Deutschland; E-Mail: herbert.schmidt@uni-hohenheim.de; <sup>2</sup>Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm; <sup>3</sup>Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich

**Schlüsselwörter:** Subtilase, Zytotoxin, Varianten, Wildwiederkäuer Subtilase Cytotoxin, Variants, wild ruminants

Bestimmte Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC)-Stämme können beim Menschen schwere Erkrankungen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen. Sie werden häufig über tierische und pflanzliche Lebensmittel auf den Menschen übertragen. Im Rahmen des BMBF-Projekts „Foodborne Zoonotic Infections of Humans (FBI-ZOO)“ wurden 75 aus Risikolebensmitteln isolierte STEC mit phänotypischen und DNA-basierten Methoden auf ihre Virulenzeigenschaften untersucht. Interessanterweise wurden bei 25 % der Stämme Genfragmente für das Subtilase Zytotoxin (SubAB) gefunden.

Das Subtilase Cytotoxin von *E. coli* ist ein AB<sub>5</sub> Toxin, welches in eukaryotischen Zellen intrazellulär das Chaperon GRP78 spaltet und so eine „unfolded protein response“ verursacht, die zum Zelltod führt. Untersuchungen der genetischen Information für das Subtilase Cytotoxin bei den *subAB*-positiven Stämmen zeigten, dass in allen Stämmen ein vollständiges *subAB* Operon vorlag. Solche Stämme wurden vor allem aus Wildwiederkäuerfleisch isoliert. Durch molekular-biologische Analysen konnte die neue Genvariante *subAB2-2* charakterisiert werden. Weitere Analysen von Kotproben von Schafen und Wildwiederkäuern an der Universität Zürich bestätigten die weite Verbreitung dieser neuen chromosomalen Variante. Auch konnte eine weitere chromosomale *subAB* Genvariante, *subAB2-3*, charakterisiert werden.

Durch Trans-kriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass im STEC-Stamm TS18/08, der die drei Toxingene *subAB1*, *cdt-V* und *stx2a* enthält, alle Toxingene während des Wachstums transkribiert werden. Weiterhin konnte durch Deletionsmutagenese gezeigt werden, dass SubAB an der Zytotoxizität des Stammes beteiligt ist. Die Analyse von rekombinant hergestellten SubAB-Toxinen zeigte, dass alle untersuchten Varianten zytotoxisch für Verozellen sind und durch Kombination der Untereinheiten neue Toxine entstehen können. Zusammenfassend deuten die Untersuchungen darauf hin, dass einige der STEC-Lebensmittelisolate als potentiell humanpathogen anzusehen sind, obgleich sie nicht dem typischen Virulenz- und Serotypmuster klinischer STEC entsprechen.

## II.

### EHEC-monitoring in raw milk soft cheese of a Swiss delicatessen

Juerg Rentsch<sup>1</sup> ([juerg.rentsch@sqts.ch](mailto:juerg.rentsch@sqts.ch)), Daniel Suter<sup>1</sup>, Timon Keller<sup>1</sup>, Niklaus Jäggi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Swiss Quality Testing Services, 1784 Courtepin, Switzerland, <sup>2</sup>Globus, 8957 Spreitenbach, Switzerland

A Swiss delicatessen with an offer of a variety of raw milk soft cheeses from France, Italy, Germany and Switzerland has been hit by three notifications of RASFF with Shiga toxin-producing *E.coli* (STEC) in soft cheese from France during 2014. Consequently, the competent food authority asked the end distributor for the implementation of appropriate measures in line with due diligence.

The lack of structured specifications and corresponding regulations hamper additionally the introduction and general acceptance of a level-appropriate monitoring along the production chain in food other than sprouts. However, actual monitoring systems are essentially based on technical specifications of an EFSA position paper [1], that have been implemented in two sequential, multiplex, real time PCR assays with a precedent 24 hours-enrichment step of samples. Primarily, genes for Shiga toxins (*stx1*, *stx2*), the virulence factor intimin (*eae*) and the seropathotype *rfbE*<sub>O157</sub> are targeted. In case of positive findings, the most common seropathotypes *wzx*<sub>O26</sub>, *galE*<sub>O103</sub>, *wzx*<sub>O104</sub>, *wbd*<sub>O111</sub> and *wzy*<sub>O145</sub> ("big six") are determined afterwards.

In 2015, a periodic STEC-monitoring of samples from incoming goods had been realised primarily from plants without STEC self-monitoring, as agreed with public authorities. Critical findings gave rise to sales ban (*stx+eae+*) and product recall (*stx+eae+/"Big six"*) with supplier block. Additionally, classical coliform counts have been performed similarly on all 325 samples from 50 cheese dairies with about 80 brands. The usual demand for strain isolation to confirm PCR results in enrichment samples had been approached by colony-hybridisation with digoxigenin-labelled DNA-probes using chemi-luminescence detection (*Roche Diagnostics GmbH*).

The following key findings could be experienced from this approach:

- I. A prevalence of 2.4% potential EHEC-genotypes (*stx+eae+*) deduced by PCR is below the expectance of a comparable study in this high-risk segment [2], but might be explainable by the positive effect of the concomitant supplier

- measurement system. Only one potential EHEC-strain (*stx1a*, *eae*, O111/H?) out of this category could be isolated by colony-hybridisation.
- II. Equal Ct-values ( $\pm 1$ Ct) of targeted virulence traits in real-time PCR provide a good estimate for an effective, subsequent strain-isolation during colony-hybridisation with this particular virulence combination. Consequently, the quantitative scale unit (Ct-value) used in real-time PCR is a useful benchmark for the preliminary assessment of a potential EHEC-genotype.
- III. In 50% of all potential EHEC findings cell numbers of *E.coli* were measured <100cfu/g. Only one potential EHEC-genotype displayed similarly high numbers in generic *E.coli* (160'000cfu/g). Commensal *E.coli* as a risk indicator for EHEC has limited significance, at least in soft cheese.

[1] European Food Safety Authority. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food. EFSA Journal 2009; 7(11):1366

[2] J. Madic et al... Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28, and O157:H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. 2011 Appl. Environ. Microbiol. 77(6):2035-2041

# E

## Abstracts – Pathogene *E.coli*

- I. Schädigung von Erythrozyten-Vorläuferzellen durch Shiga Toxin und Neoglykolipide aus Pektinen als Shiga Toxin-Inhibitoren  
*J. Müthing et al., Münster*
  
- II. Funktionale Charakterisierung von Aggregative Adherence Fimbrien (AAF) von *Escherichia coli*  
*U. Dobrindt, Münster*

## I.

# Schädigung von Erythrozyten-Vorläuferzellen durch Shiga Toxin und Neoglykolipide aus Pektinen als Shiga Toxin-Inhibitoren

*Johannes Müthing und Helge Karch*

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster  
E-Mail: jm@uni-muenster.de

**Schlüsselwörter:** Shiga Toxine, Hämatopoese, Anämie, Neoglykolipide, Wirkstoffentwicklung

**Keywords:** Shiga toxins, hematopoiesis, anemia, neoglycolipids, drug development

Shiga Toxin (Stx)-produzierende enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) verursachen schwere extraintestinale Komplikationen, wie z.B. das hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS). Eine Stx-vermittelte Schädigung der mikrovaskulären Endothelzellen in den Nieren und im Gehirn führt zu thrombotischen Gefäßverengungen. Die mit einem HUS einhergehende Anämie wird auf eine mechanische Schädigung der Erythrozyten durch verengte Mikrokapillaren zurückgeführt.

Von uns konnte jetzt gezeigt werden, dass Stx in die Erythropoese des Menschen eingreift und, ausgehend von hämatopoetischen CD34<sup>+</sup>-Stammzellen, die Erythrozyten in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung, bevorzugt auf der Stufe der basophilen und polychromatischen Erythroblasten, erheblich schädigt. Aus diesen Befunden sollten sich neue Therapieoptionen für EHEC-Erkrankungen ergeben. Ebenfalls neu ist die Erkenntnis, dass Pektine, die als Geliermittel („Opekta“) in der Lebensmittelindustrie Verwendung finden, das Ausgangsmaterial für potentielle Stx-Inhibitoren darstellen. Diese pflanzlichen Polysaccharide (Polygalakturonsäuren), die *per se* keine Stx-Bindung aufweisen, können durch zwei einfache chemische Reaktionen in Stx-bindende Oligosaccharide mit terminaler Galaktose in  $\alpha$ 1-4-Konfiguration überführt werden. Koppelt man anschließend die produzierten Oligosaccharide an einen Lipidanker (Phosphatidylethanolamin), erhält man ein Neoglykolipid, das beispielsweise in Form eines Liposomenpräparates als Therapeutikum bei EHEC-Infektionen eingesetzt werden könnte.

Dieser Beitrag informiert zum aktuellen Stand der Stx-Forschung hinsichtlich der zellulären Schädigungen im menschlichen Organismus, die einer EHEC-Infektion zugrunde liegen, und liefert ein Beispiel dafür, wie die Grundlagenforschung zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Stx-Rezeptor-Interaktion zur Entwicklung von neuen potentiellen Anti-Stx-Wirkstoffen führen kann.

## II.

### **Funktionale Charakterisierung von Aggregative Adherence Fimbrien (AAF) von *Escherichia coli***

*Michael Knödler, Michael Berger, Ulrich Dobrindt*

Institut für Hygiene, Universität Münster, E-Mail: [dobrindt@uni-muenster.de](mailto:dobrindt@uni-muenster.de)

**Schlüsselwörter:** EHEC, EAEC, AAF-Fimbrien, Adhärenz, Biofilmbildung

**Keywords:** EHEC, EAEC, Aaf fimbriae, adherence, biofilm formation

Die pAA-kodierten „Aggregative Adherence Fimbriae“ (AAF) gelten als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von enteroaggregativen *E. coli* (EAEC), da diese Adhäsine eine Schlüsselfunktion bei der EAEC Pathogenese, die Adhärenz an das Darmepithel, vermitteln und somit die intestinale Kolonisierung sowie die Biofilmbildung fördern. Seit dem *E. coli* O104:H4 Ausbruch 2011 stehen AAF Fimbrien auch im Zusammenhang mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), da der O104:H4 Ausbruchstamm AAF/I Fimbrien exprimiert. Weitere Beispiele für Hybridstämme wurden beschrieben, welche Biomarker verschiedener *E. coli* Pathotypen vereinen und auch AAF-Fimbrien exprimieren oder zumindest einen aggregativen Adhärenz-Phänotyp aufweisen. Inzwischen sind fünf Varianten der AAF Hauptstrukturuntereinheit (AAF/I – AAF/V) bekannt. Im Zusammenhang mit dem O104:H4 Ausbruch stellte sich die Frage, inwieweit AAF-Fimbrien für die außergewöhnliche Pathogenität des Ausbruchstammes verantwortlich sind und ob der Austausch von AAF/III- (historischer O104:H4 Stamm, HUSEC041) gegen AAF/I-Fimbrien (O104:H4 Ausbruchstamm aus dem Jahr 2011) zur besonderen Pathogenität des Ausbruchstammes von 2011 beigetragen haben könnte. Um verschiedene AAF-Fimbrienvarianten phänotypisch vergleichen zu können, klonierten wir die entsprechenden Determinanten in einen Expressionsvektor. Die verschiedenen AAF-Varianten wurden im identischen *E. coli* K-12 Hintergrund exprimiert, um anschließend bakterielle Autoaggregation, Adhäsion an intestinale Epithelzellen sowie Biofilmbildung unter direkt vergleichbaren Bedingungen zu analysieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass AAF/I, AAF/III and AAF/V Fimbrien deutlich an der Ausprägung der untersuchten Phänotypen beteiligt sind, während die Expression von AAF/II und AAF/IV Fimbrien nur einen schwachen Einfluss auf den aggregativen und adhäsiven Phänotyp hatte. Unsere Daten legen nahe, dass die Expression unterschiedlicher AAF-Fimbrienvarianten nicht notwendigerweise mit der Ausprägung verschiedener Phänotypen korreliert.

Ob individuelle AAF Fimbrienallele jedoch untereinander austauschbar sind, ohne die bakteriellen Virulenzeigenschaften zu beeinflussen, muss zukünftig weiter untersucht werden.



## Abstracts – Pathogenitätsfaktoren und Genomics

- I. Prophagenkodierte Enzyme von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 ermöglichen die Nutzung von 5-N-Acetyl-9-O-Acetyl-Neuraminsäure als Kohlenstoffquelle  
*N. Saile, Hohenheim*
- II. Eine neue Perspektive auf ein altes Problem: Kernelemente der Replikationskontrolle des ESBL Plasmides pO104\_90 von *Escherichia coli* O104:H4 regulieren auch die Transferfrequenz  
*M. Berger, Münster*
- III. The virulence-associated primary transcriptome of EHEC 104:H4  
*P. Berger, Münster*
- IV. Thin-layer chromatography mass spectrometry imaging of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in crude lipid extracts  
*I. Kouzel et al., Münster*
- V. Shiga Toxin Glykosphingolipid-Rezeptoren und ihre Assoziation mit lipid raft-Mikrodomänen in MDCKII Nierenepithelzellen  
*N. Legros et al., Münster*
- VI. Biosensor-basierte Echtzeit-Interaktionsanalysen von Shiga Toxinen mit Glykosphingolipid-Rezeptoren in Modellmembranen  
*D. Steil et al., Münster*

- VII *in-vitro* Charakterisierung von Virulenzeigenschaften symptomatischer und asymptomatischer enterohämorrhagischer *Escherichia coli* Isolate der Serogruppe O91  
*J. Putze, Münster*
- VIII Neoglykolipide pflanzlichen Ursprungs verringern die Zytotoxizität von Shiga Toxinen aus EHEC gegenüber Vero-Zellen  
*D. Rubin, Münster*

## I.

# Prophagenkodierte Enzyme von *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 ermöglichen die Nutzung von 5-*N*-Acetyl-9-*O*-Acetyl-Neuraminsäure als Kohlenstoffquelle

Nadja Saile<sup>1</sup>, Simone Nübling<sup>1</sup>, Anja Voigt<sup>1</sup>, Timo Stressler<sup>2</sup>, Lutz Fischer<sup>2</sup>,  
Herbert Schmidt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene, <sup>2</sup>Biotechnologie und Enzymwissenschaft, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Garbenstraße 25 und 128, 70599 Stuttgart, E-Mail: [nadja.saile@uni-hohenheim.de](mailto:nadja.saile@uni-hohenheim.de)

**Keywords:** EHEC O157:H7, NanS, Neuraminsäuren (neuraminic acids), Neu 5,9Ac<sub>2</sub>-Esterasen (Neu 5,9Ac<sub>2</sub>-esterases), Prophagen (prophages)

Prophagenkodierte Shiga Toxine (Stx) sind die Hauptvirulenzfaktoren enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC). Interessanterweise tragen Stx-kodierende und andere im Genom von EHEC-Stämmen befindliche Prophagen Gene, die homolog zum chromosomalen *E. coli* Gen *nanS* sind. Um im Dickdarm gegenüber anderen Mikroorganismen kompetitiv zu sein und erfolgreich kolonisieren zu können, müssen EHEC in der Lage sein verschiedene Kohlenstoffquellen zu nutzen. Eine dieser Quellen ist die Gruppe der Neuraminsäuren, die unter anderem mit den Glykoproteinen des humanen Mukus assoziiert sind. Hauptsächlich kommen die Derivate 5-*N*-Acetyl Neuraminsäure (Neu5Ac), 5-*N*-Acetyl-9-*O*-Acetyl Neuraminsäure (Neu 5,9Ac<sub>2</sub>) und 5-*N*-Acetyl-1,7-Lacton Neuraminsäure im Darm vor. Die verantwortlichen Stoffwechselwege für deren Nutzung werden von dem chromosomalen *nan*-Operon codiert. Dieses enthält vor allem Gene, die für die Metabolisierung von Neu5Ac nötig sind, aber auch das *nanS* Gen. NanS ist eine Neu 5,9Ac<sub>2</sub>-Esterase, die die *O*-acetylierte Gruppe von C9 abspaltet und somit Neu 5,9Ac<sub>2</sub> zu Neu5Ac umwandelt. Im EHEC O157:H7 Stamm EDL933 wurden mehrere *nanS*-homologe offene Leserahmen auf Prophagen identifiziert. Warum EHEC neben dem chromosomalen *nanS* weitere *nanS*-Homologe beherbergen, ist bisher unbekannt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich Deletionen in den einzelnen *nanS*-Homologen auf das Wachstumsverhalten von EDL933 mit Neu5,9Ac<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle auswirken. Des Weiteren wurden ausgewählte *nanS*-Homologe

näher enzymatisch charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass EDL933 Neu5Ac und Neu 5,9Ac<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle verwenden kann. Nach Deletion des chromosomalen *nanS* war kein Wachstumsunterschied feststellbar.

Im Vergleich dazu verliert der Laborstamm *E. coli* C600 mit Deletion des *nanS* Gens seine Fähigkeit auf Neu 5,9Ac<sub>2</sub> zu wachsen. Wurden die *nanS*-homologen Gene in EDL933 deletiert, war ebenfalls kein Wachstum mehr feststellbar. Vier rekombinant hergestellte NanS-Homologe zeigten unterschiedliche enzymatische Charakteristika und waren in der Lage O-Acetylreste aus Rinderspeicheldrüsenmucin freizusetzen. Des Weiteren konnte die Wachstumsdefizienz von *E. coli* C600Δ*nanS* durch externe Zugabe der rekombinant hergestellten NanS-Homologen komplementiert werden. Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse zur Bedeutung der EDL933 Prophagen für die Verwendung von Neuraminsäurederivaten als Kohlenstoffquelle.

## II.

### **Eine neue Perspektive für ein altes Problem: Kernelemente der Replikationskontrolle des ESBL Plasmides pO104\_90 von *Escherichia coli* O104:H4 regulieren auch die Transferfrequenz**

Michael Berger, Ulrich Dobrindt

Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster, E-Mail: [Michael.Berger@ukmuenster.de](mailto:Michael.Berger@ukmuenster.de)

Im Jahr 2011 verursachte *Escherichia coli* O104:H4 (*E. coli* O104:H4) einen großen Ausbruch mit mehr als 800 Fällen von hämolytisch urämischem Syndrom und mehr als 50 Toten in Deutschland. Das natürliche Reservoir dieses Stammes wurde nie gefunden. Da dieser hypervirulente Stamm sowohl typische Virulenzmarker für enterohemorragische *E. coli*, als auch für enteroaggregative *E. coli* besitzt, wird er oft als Hybridstamm bezeichnet. Neben dem ca. 75 kbp großen Plasmid pO104\_75, das für aggregative Anheftungsfimbrien kodiert, besitzt *E. coli* O104:H4 auch noch das ca. 90 kbp große Plasmid pO104\_90, das für zwei Beta-Lactamasen kodiert und ein ca. 1,5 kbp großes kryptisches Plasmid. Bakterielle Konjugation ist einer der Hauptmechanismen des horizontalen Gentransfers und könnte bei der Entstehung von *E. coli* O104:H4 eine wesentliche Rolle gespielt haben. Plasmid pO104\_75 besitzt selbst kein funktionales Transfergencluster und kann sich daher selbst nicht mobilisieren. Plasmid pO104\_90 besitzt allerdings funktionale Transfergene und kann, wie wir zeigen konnten, von *E. coli* K-12 auf andere klinisch relevante Enterobacteriaceen und von diesen auf *E. coli* K-12 übertragen werden, wenn auch in wesentlich geringerer Frequenz als das konjugative Plasmid RP4.

Mit Hilfe von Deletionsmutanten von pO104\_90 konnten wir Bereiche des Plasmides identifizieren, die für seinen Transfer und die Stabilität des Plasmides essentiell sind. Wurden Bereiche des Plasmides entfernt, die für Stabilitätsfaktoren kodieren, so entstanden Zellen die sowohl ein Wildtyp Plasmid, als auch eine verkürzte Version enthielten. Diese Zellen übertrugen pO104\_90 mit einer dem Plasmid RP4 ähnlichen Frequenz. Durch die gezielte Herstellung von Zellen, die „diploid“ für pO104\_90 sind, konnten wir zeigen, dass sich mit der Plasmidkopienzahl die Transferfrequenz drastisch erhöht. Anschließend konnten wir zeigen, dass zusätzliche Kopien von *repY/INC*, bekannten Kernelementen der Replikationskontrolle von IncI Plasmiden

ausreichen, um diesen seit ca. 50 Jahren für Incl Plasmiden bekannten, sogenannten *drd* Phänotypen zu vermitteln. Damit konnten wir auch zum ersten Mal eine direkte Verbindung von Kernelementen der Replikationskontrolle mit der Transferkontrolle eines Incl Plasmides herstellen.

Abschließend diskutieren wir, wie sich dies auf den potentiellen Co-Transfer von anderen Plasmiden und chromosomalen Markern und damit auf die Entstehung neuer bakterieller Stämme auswirken könnte.

### III.

#### **The virulence-associated primary transcriptome of EHEC O104:H4**

*Petya Berger*<sup>1</sup>, *Konrad Förstner*<sup>2,3</sup>, *Cynthia M. Sharma*<sup>3</sup>, *Jörg Vogel*<sup>2</sup>, *Helge Karch*<sup>1</sup>,  
*Alexander Mellmann*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Hygiene, University of Münster, Münster, Germany; <sup>2</sup>Institute for Molecular Infection Biology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, <sup>3</sup>Research Center for Infectious Diseases, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Korrespondenzadresse: [petya.berger@ukmuenster.de](mailto:petya.berger@ukmuenster.de)

**Schlüsselwörter:** EHEC O104:H4, dRNA-seq, Primärtranskriptom, Virulenzgene

**Keywords:** EHEC O104:H4, dRNA-seq, primary transcriptome, virulence genes

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotype O104:H4 (EHEC O104:H4) was characterized as the causative agent of the largest German outbreak (May-July 2011), in which more than 3800 people were infected, and of these more than 850 (22%) developed HUS [1]. Whole genome sequencing revealed that the highly pathogenic outbreak strain carries key virulent determinants of both EHEC and enteroaggregative *Escherichia coli* [2]. However, not much is known about their transcriptional organization and gene regulation. Here, we analyzed the primary transcriptome of the EHEC O104:H4 clinical isolate LB226692 using differential RNA sequencing (dRNA-seq). This method includes an enzymatic step prior to RNA-seq, in which Terminator exonuclease degrades RNAs with a 5' monophosphate (i.e. processed transcripts), but not with a 5' triphosphate structure (i.e. primary transcripts), and thus allows for the high throughput mapping of transcription start site (TSS) and non-coding RNA candidates [3]. The dRNA-seq analysis revealed a high complexity of the EHEC O104:H4 primary transcriptome and the transcriptional organization of chromosome- and pAA plasmid-encoded virulence determinants. We detected TSS for the majority of virulence genes and operons. In addition, we mapped TSS within virulence operons, which could allow for transcriptional uncoupling of these polycistronic clusters. Interestingly, we detected abundant antisense RNAs (asRNAs), among others, against the genes for the chromosome-encoded serine protease Pic and the pAA-encoded dispersin, suggesting for an important role of asRNA-mediated regulation in EHEC O104:H4 pathogenicity. The

biological significance of these asRNAs is under current investigation. Taken together, our data advances our understanding and provides the basis for further investigations of EHEC O104:H4 virulence gene expression and regulation.

[1] Karch H, Denamur E, Dobrindt U, Finlay BB, Hengge R, Johannes L, Ron EZ, Tonjum T, Sansonetti PJ, Vicente M. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med* 2012; 4:841-848.

[2] Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 2011; 6:e22751.

[3] Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiss S, Sittka A, Chabas S, Reiche K, Hackermuller J, Reinhardt R, Stadler PF, Vogel J. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 2010; 464:250-255.

## IV.

### Thin-layer chromatography mass spectrometry imaging of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in crude lipid extracts

*Ivan U. Kouzel, Jens Soltwisch, Alexander Pirkl, Gottfried Pohlentz, Klaus Dreisewerd, Helge Karch, Johannes Müthing*

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster  
E-Mail: [ivan.kouzel@uni-muenster.de](mailto:ivan.kouzel@uni-muenster.de)

**Schlüsselwörter:** Shiga Toxine, Glykosphingolipide, Dünnschichtchromatographie, IR-MALDI-MSI

**Keywords:** Shiga toxins, glycosphingolipids, thin-layer chromatography, IR-MALDI-MSI

Shiga toxins (Stxs) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are the main virulence factors implicated in the development of diseases in humans ranging from diarrhea to life threatening hemolytic uremic syndrome (HUS) [1]. Stxs bind to glycosphingolipid (GSL) receptors globotriaosylceramide (Gb3Cer) and globotetraosylceramide (Gb4Cer), which act as high- and low-affinity receptors, respectively, of various human target cells.

Thin-layer chromatography (TLC) of GSLs, combined with immunodetection and infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (IR-MALDI-MSI), is a powerful tool for profiling the GSL repertoire of eukaryotic cells. However, TLC-IR-MALDI-MSI of GSLs in crude lipid extracts is still an analytical challenge due to their low ionization being disturbed by highly abundant phospholipids. Therefore, we developed a strategy for detection and visualization of Stx GSL receptors for which we pretreated a chloroform-methanol cell extract with phospholipase C (PLC) followed by structural IR-MALDI-MS analysis of immunostained GSLs directly on the TLC plate. A Synapt G2-S mass spectrometer (Waters) equipped with an optical parametric oscillator laser ( $\lambda = 2.94 \mu\text{m}$ ; 20 Hz, focal spot size  $\sim 50 \mu\text{m}$ ) was employed to acquire the MS imaging data with a pitch size of  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  using lipid extracts from human monocytic THP-1 cells. This concept allowed for the detection and structural analysis of Stx receptors Gb3Cer and Gb4Cer on nanogram scale, which were found to be expressed by THP-1 cells

as various lipofoms harbouring the dihydroxylated aminoalcohol sphingosine (d18:1) and a fatty acid with variable chain length (C16 to C24) in the ceramide moiety. We could show that simple PLC-pretreatment of an unpurified lipid extract, which contained GSLs as minor constituents, is sufficient for comprehensive TLC IR-MALDI-MSI avoiding any laborious GSL purification procedures. This approach allows for unravelling the heterogeneity of GSLs in small-sized samples regarding their ceramide anchors and oligosaccharide chains providing a supplementary tool for MALDI-MSI of tissue sections.

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

## V.

### Shiga Toxin Glykosphingolipid-Rezeptoren und ihre Assoziation mit *lipid raft*-Mikrodomänen in MDCKII Nierenepithelzellen

Nadine Legros, Gottfried Pohlentz, Helge Karch, Johannes Müthing

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster  
E-Mail: [Nadine.Legros@ukmuenster.de](mailto:Nadine.Legros@ukmuenster.de)

**Schlüsselwörter:** Shiga Toxine, MDCKII-Zellen, Glykosphingolipide, Detergenz-resistente Membranen

**Keywords:** Shiga toxins, MDCKII cells, glycosphingolipids, detergent-resistant membranes

Bei den von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) freigesetzten Shiga Toxinen (Stx) handelt es sich um die am besten charakterisierten Virulenzfaktoren von EHEC. Ausgehend von schweren Durchfallerkrankungen sind sie für lebensbedrohliche extraintestinale Komplikationen, wie z.B. das hämolytisch-urämische Syndrom, verantwortlich. Die organschädigende Wirkung von Stx beruht auf ihrer präferentiellen Zytotoxizität gegenüber Endothelzellen der Nieren, wobei Epithelzellen der Niere bislang nur unzureichend untersucht wurden.

Im Rahmen des vorgestellten Projektes stellte sich die Frage, ob die weltweit in den verschiedensten Zellkulturmodellen eingesetzte MDCKII-Zelllinie, die sich von einer Epithelzelle aus der Niere eines Cocker Spaniels ableitet (MDCK, *Madin-Darby Canine Kidney*), Stx-Rezeptoren exprimiert und ob diese Zellen eine vergleichbare Zytotoxizität wie die klassischen Vero-Zellen aufweisen. Dazu wurden zunächst die Glykosphingolipide (GSL) aus MDCKII-Zellen mittels Ionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Als Hauptkomponenten wurden die GSL Globotriaosylceramid (Gb3Cer), Globotetraosylceramid (Gb4Cer) und das dominante Forssman-GSL dünnschichtchromatographisch in Kombination mit Immundetektion und Elektrospray-Ionisations(ESI)-Massenspektrometrie identifiziert [1]. Die Strukturanalysen ergaben Gb3Cer-, Gb4Cer- und Forssman-Lipoforen mit Cer(d18:1, C24:1/C24:0) und Cer(d18:1, C16:0), die die hohe Variabilität der GSL-Lipidanker belegen. Der Nachweis der Assoziation dieser Stx-Rezeptoren mit Mikrodomänen (*lipid rafts*) wurde unter Zuhilfenahme von Detergenz-resistenten

Membranen (DRMs), die mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert wurden [2], erbracht. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass Gb3Cer, Gb4Cer und das Forssman-GSL mit den *lipid raft*-Markern Sphingomyelin und Cholesterol in Mikrodomänen kolokalisieren. Trotz Präsenz von Stx-Rezeptoren zeigten MDCKII-Zellen, im Vergleich zu hochsensiblen Vero-B4-Zellen, nur eine äußerst schwache Sensitivität gegenüber Stx, ein Befund, der weitere Untersuchungen erforderlich machen wird.

[1] Meisen I, Rosenbrück R, Galla HJ, Hüwel S, Kouzel IU, Mormann M, Karch H, Müthing J. Expression of Shiga toxin 2e glycosphingolipid receptors of primary porcine brain endothelial cells and toxin-mediated breakdown of the blood-brain barrier. *Glycobiology* 2013; 23: 745-759.[2] Kouzel IU, Pohlentz G, Storck W, Radamm L, Hoffmann P, Bielaszewska M, Bauwens A, Cichon C, Schmidt MA, Mormann M, Karch H, Müthing J. Association of Shiga toxin glycosphingolipid receptors with membrane microdomains of toxin-sensitive lymphoid and myeloid cells. *J Lipid Res* 2013; 54: 692-710.

## VI.

### **Biosensor-basierte Echtzeit-Interaktionsanalysen von Shiga Toxinen mit Glykosphingolipid-Rezeptoren in Modellmembranen**

*Daniel Steil, Gottfried Pohlentz, Michael Mormann, Helge Karch, Johannes Müthing*

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster  
E-Mail: Daniel.Steil@ukmuenster.de

**Schlüsselwörter:** Shiga Toxine, EHEC, Glykosphingolipide, Bindungskinetiken, SAW

**Keywords:** Shiga toxins, EHEC, glycosphingolipids, binding kinetics, SAW

Shiga Toxine (Stx) aus pathogenen enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)-Bakterien verursachen massive Schädigungen des mikrovaskulären Endothels der Nieren und des Gehirns. Blutige Durchfälle können sich im Verlauf einer EHEC-Infektion zu einer hämorrhagischen Colitis bis hin zum lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) entwickeln [1]. Das Krankheitsbild beruht auf der Fähigkeit der B-Untereinheiten von Stx (AB<sub>5</sub>-Toxin), präferentiell an die Oligosaccharid-Kopfgruppe des Glykosphingolipids (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und in geringerem Ausmaß auch an die Oligosaccharid-Kette von Globotetraosylceramid (Gb4Cer) zu binden, woraufhin der Toxin-Rezeptor-Komplex von der Zelle aufgenommen wird. Die Stx-Rezeptoren befinden sich bevorzugt in Mikrodomänen (*lipid rafts*) der äußeren Schicht der Plasmamembran (Doppelmembran), zusammen mit den *lipid raft*-Markern Sphingomyelin und Cholesterol, was offenbar der Bindung und Internalisierung von Stx förderlich ist [3]. Der initiale Bindungsschritt, insbesondere der genaue Mechanismus der spezifischen Rezeptor-Stx-Interaktion, ist Gegenstand aktueller biophysikalischer Forschung. Mithilfe von Echtzeit-Interaktionsstudien lässt sich dieser Mechanismus durch Assoziations- und Dissoziationsverläufe im Detail darstellen. Zu diesem Zweck wurde, ausgehend von Liposomen definierter Größe, eine Modellmembran, bestehend aus GSL, Cholesterol, Sphingomyelin und den Phospholipiden Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin, in einem Adsorptions-Fusions-Prozess auf die Oberfläche eines *Surface Acoustic Wave* (SAW) Biosensors aufgebracht.

Erste GSL-Bindungsstudien erfolgten mit Anti-Gb3Cer- und Anti-Gb4Cer-Antikörpern, um das Interaktionsmodell zu validieren. Die anschließenden Echtzeit-Interaktionsanalysen mit verschiedenen Stx-Subtypen aus EHEC-Wildtypstämmen lieferten Bindungskinetiken, basierend auf Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten, die gemäß einem 1:1 Rezeptor-Liganden Modell erstellt bzw. berechnet wurden. Dieses Interaktionsmodell wird es zukünftig erlauben, mögliche Unterschiede im Bindungsverhalten der verschiedenen Stx-Subtypen und ihrer Varianten aufzuzeigen, was für die Entwicklung neuartiger Stx-Blocker von Nutzen sein wird.

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

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

[3] Sonnino S, Prinetti A. Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem* 2013; 20: 4-21.

## VII.

### ***in-vitro* Charakterisierung von Virulenzeigenschaften symptomatischer und asymptomatischer enterohämorrhagischer *Escherichia coli* Isolate der Serogruppe O91**

Johannes Putze, Alexander Mellmann, Ulrich Dobrindt

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster,  
E-Mail: ([johannes.putze@ukmuenster.de](mailto:johannes.putze@ukmuenster.de))

**Schlüsselwörter:** Asymptomatische Kolonisierung, Zytotoxizität, Serotyp O91

**Keywords:** Asymptomatic colonisation, cytotoxicity, serotype O91

Lebensmittelpathogene enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) können schwere intestinale Erkrankungen, wie z.B. Gastroenteritis mit sich anschließend entwickelnder enterohämorrhagischer Colitis, auslösen. Als schwere Komplikation kann es während einer Infektion mit EHEC zum hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) kommen. Die für die Erkrankung verantwortlichen bakteriellen Virulenzfaktoren sind vielfältig: der „*Locus of Enterocyte Effacement (LEE)*“ ermöglicht eine starke Assoziation der Bakterien an das Darmepithel, während die Produktion von Shiga Toxin und dessen Aufnahme in die Zellen zur Inhibition der Ribosomen und Zelltod führt. Darüber hinaus sind EHEC in der Lage ein Plasmid-kodiertes Hämolysin zu exprimieren, welches die Lipidmembranen eukaryotischer Zellen schädigt. Neben diesen schwerwiegenden gesundheitlichen Auswirkungen können Individuen aber auch asymptomatisch durch EHEC Stämme kolonisiert sein und potentiell den Erreger bei engem Kontakt mit anderen Menschen weiter verbreiten. Interessanterweise ist die asymptomatische Kolonisierung von Rindern, Schafen und Ziegen mit EHEC als natürliches Reservoir bekannt. Ziel dieser Studie ist die Aufklärung der Mechanismen, die für symptomatische und asymptomatische Kolonisierung durch EHEC Stämme des gleichen Serotyps verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden verschiedene eng verwandte EHEC O91 Isolate, welche von symptomatischen oder asymptomatischen Trägern isoliert wurden, phänotypisch untersucht.

Insgesamt neun EHEC O91 Isolate, die von Patienten mit Durchfall und/oder HUS oder von asymptomatischen Trägern stammen, wurden hinsichtlich ihrer Shiga Toxin-Produktion mittels ELISA-Technik untersucht. Zusätzlich wurde die Zytotoxizität gegenüber Vero Zellen, die neben Shiga Toxin auch durch andere Faktoren wie das EHEC-Hämolysin beeinflusst wird, bestimmt. Auch die Adhäsionsfähigkeit der Isolate an Epithelzellen wurde in Zellkultur getestet. Die untersuchten EHEC O91 Isolate zeigten eine unterschiedlich starke Produktion von Shiga Toxin und verschieden starke Zytotoxizität gegenüber Vero Zellen *in vitro*. Auch die Adhäsionsfähigkeit der verschiedenen Isolate variierte teils deutlich. Allerdings konnte nicht immer eine eindeutige Korrelation zwischen symptomatischer bzw. asymptomatischer Herkunft und der gemessenen *in vitro* Pathogenität gezogen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Korrelation zwischen Virulenz-assoziierten Phänotypen bei EHEC O91 Isolaten mit der klinischen Manifestation bisher nicht möglich ist. Weitere Vergleiche von symptomatischen und asymptomatischen Isolaten bestimmter Serotypen, wie z.B. O91:H21, O91:H14 und O91:H-, werden weitere Hinweise darauf geben, ob asymptomatische Besiedlung allein eine Folge verminderter Expression von Virulenzfaktoren sein kann oder aber auch entsprechende Wirtsfaktoren am symptomatischen oder asymptomatischen Verlauf der Infektion beteiligt sind.

## VIII.

### Neoglykolipide pflanzlichen Ursprungs verringern die Zytotoxizität von Shiga Toxinen aus EHEC gegenüber Vero-Zellen

Dennis Rubin, Gottfried Pohlentz, Daniel Steil, Helge Karch, Johannes Müthing

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster  
E-Mail: dennis.rubin@ukmuenster.de

**Schlüsselwörter:** Shiga Toxine, Neoglykolipide, Rezeptoren, Pektine, Liposomen

**Keywords:** Shiga Toxins, neoglycolipids, receptors, pectins, liposomes

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) stellen eine bedeutende Subgruppe Shiga Toxin (Stx)-produzierender *E. coli* dar. Sie können schwere und lebensbedrohliche Erkrankungen, wie z.B. fulminante hämorrhagische Colitiden oder das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen. Hierbei bindet Stx nach Transfer in den Blutkreislauf an das auf der Zelloberfläche von mikrovaskulären Endothelzellen lokalisierte Glykosphingolipid Globotriaosylceramid (Gb3Cer), das den präferentiellen Stx-Rezeptor darstellt [1]. Nach Bindung und Internalisierung des Toxins wird eine Kaskade angestoßen, die letztendlich mit der Zerstörung der betroffenen Targetzellen endet. Das Hauptziel des vorgestellten Projektes besteht in der Entwicklung neuartiger Glyko-Konstrukte mit Inhibitionspotential gegenüber Stx, mit deren Hilfe die Interaktion von Stx mit Zellen des mikrovaskulären Endothels unterbunden werden soll. Auf diese Weise soll die Zytotoxizität von Stx abgeschwächt oder im Optimalfall vollständig neutralisiert werden.

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Neoglykolipiden (NeoGL) dienten Pektine (Polygalakturonsäuren) aus Obst. Diese wurden zunächst chemisch zu Galaktopolysacchariden reduziert. Letztere wurden anschließend mittels saurer Hydrolyse in Oligosaccharide gespalten. Durch Kopplung an die Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) gelang es, NeoGL mit  $\alpha$ 1-4-gebundenen Galakto-Oligosacchariden, bestehend aus 2 bis 7 Galaktosemolekülen, herzustellen. Die so produzierten NeoGL, deren Strukturen mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden, zeigten im Dünnschichtchromatographie Overlay Assay unterschiedliche, aber für jeden der untersuchten Stx1a-, Stx2a- und Stx2e-Subtypen spezifische

Bindungsmuster, anhand derer einzig mit dem Überstand einer EHEC-Kultur eine Stx-Subtypisierung vorgenommen werden kann.

Weiterhin zeigten die Stx-bindenden NeoGL in Zytotoxizitätstests eine inhibitorische Wirkung gegenüber Vero-B4-Zellen in Form einer Minderung der durch Stx verursachten Zellschädigung. Die Applikation der NeoGL erfolgte als Liposomenpräparation, was eine von vielen Möglichkeiten der Anwendung der aus Pektinen stammenden Galakto-Oligosaccharide demonstriert. Die von uns getesteten NeoGL zeigen beispielhaft die Entwicklung eines potentiellen Glyko-Pharmazeutikums auf Pflanzenbasis, das zukünftig gegen durch EHEC verursachte Erkrankungen eingesetzt werden könnte.

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



## Abstracts – Poster

### Epidemiologie

- I. Genomsequenzierung von EHEC O103:H2–Isolaten aus einer Erkrankungshäufung in einer Kindereinrichtung in Erlangen, 2015  
*C. Lang et al., Wernigerode*
  
- II. Netzwerk für Molekulare Surveillance von EHEC-Infektionen in Deutschland  
*A. Fruth et al., Wernigerode*
  
- III. Hemolytic uremic syndrome in a 65 year-old male linked to a very unusual type of *stx2e* and *eae* harboring O51:H49 Shiga toxin producing *Escherichia coli*  
*D. Fasel et al., Basel*
  
- IV. Characteristics of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains isolated during 2010-2015 from human infections in Switzerland  
*N. Cernela et al., Zürich*

## Nachweisverfahren und Diagnostik

- V. Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis lebensfähiger EHEC/EPEC  
*B. Fröschle et al., Freising*
  
- VI. Optimierte Induktion der Shiga Toxin-Expression in enterohämorrhagischen  
*Escherichia coli*  
*T. Guo et al., Münster*
  
- VII. Ringversuch zur Identifizierung von enterotoxischen und enterotoxämischen  
*Escherichia coli* des Schweines  
*K. Kerner et al., Gießen*

## EHEC und Lebensmittel

- VIII. Effects of different media on the enrichment of low numbers of Shiga toxin-  
producing *Escherichia coli* in mungo bean sprouts and on the development of  
the sprout microbiome  
*R. H. Margot et al., Zürich*
  
- IX. Studie zur Besiedelung von Bockhornkleesamen und Sprossen mit dem  
Ausbruchsstamm EHEC O104:H4 (2011)  
*I. Huber et al., Oberschleißheim*

## EHEC in Tier und Umwelt

- X. Studien an Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) der Serogruppen  
O27, O91 und O113 aus Human-, Rind-, Schaf- und Wildproben  
*S. Neubauer et al., Graz*
  
- XI. Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) in Faecesproben von  
Wildschweinen aus Polen  
*N. Drees et al., München*

### **Pathogene E. coli**

XII. Genomsequenzierung von zwei neuen EHEC/EAEC hybrid Stämmen aus menschlichen Infektionen

*C. Lang et al., Wernigerode*

XIII. Occurrence of uropathogenic and enteric pathogenic virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans

*M. Nüesch-Inderbinnen et al., Zürich*

### **Pathogenitätsfaktoren und Genomics**

XIV. The accessory genome correlates with the colonization type of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of bovine origin

*S. A. Barth et al., Jena*

XV. Switching the O-antigen gene cluster in *Escherichia coli* – an opportunity for STEC to persist longer in cattle?

*L. Geue et al., Jena*

XVI. *N*-Acylglukosamin-Derivate verändern die Glykosphingolipid-Expression und damit das Repertoire an Shiga Toxin-Rezeptoren von humanen Epithelzellen

*K.-A. Jarosch et al., Münster*

## I.

### **Ganzgenomsequenzierung von EHEC O103:H2-Isolaten aus einer Erkrankungshäufung in einer Kindereinrichtung in Erlangen, 2015**

*Christina Lang<sup>\*1</sup>, Angelika Fruth<sup>\*1</sup>, Regina Konrad<sup>2</sup>, Wolfgang Hautmann<sup>2</sup>, Joachim Balsliemke<sup>2</sup>, Erhard Tietze<sup>1</sup>, Rita Prager<sup>1</sup>, Antje Flieger<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Burgstrasse 37, 38855 Wernigerode

<sup>2</sup>Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstrasse 2, 85762 Oberschleißheim

\* contributed equally

**Schlüsselwörter:** EHEC O103:H2, Ausbruch, Genomsequenzierung

Im Dezember 2015 wurde ein Ausbruch mit EHEC O103:H2 in einer Kindereinrichtung in Bayern, gemeldet. 23 Fälle wurden registriert, darunter waren 17 Kinder im Alter von 1 - 4 Jahren, 2 ältere Kinder und 4 Erwachsene. Die Symptomatik bestand weitestgehend aus milden wässrigen Durchfällen ohne HUS. Eine Infektionsquelle konnte nicht ermittelt werden. Nach Gewinnung der Isolate am LGL Oberschleißheim, wurden am NRZ 13 Patientenisolate weiterführend typisiert. Alle Isolate gehörten dem Serovar O103:H2 an und waren positiv für die Gene *stx1*, *eaeA*, *ehxA*. Die PFGE-Analyse ergab ein identisches Muster mit nicht mehr als einer Bande Abweichung. Nach Genomanalyse wurde das O-Antigen-Gen-Cluster und das *fliC*-Gen verifiziert, der MLST ST17 und weitere Virulenzgene bestimmt. Nach Ausschluss der Ambiguitäten und nicht abgedeckten Bereiche zum Referenzgenom EHEC O103:H2 Stamm 12009 wurde die Anzahl der SNPs bestimmt. Die Isolate unterschieden sich dabei untereinander in maximal 9 Positionen.

Über die Informationsplattform des ECDC, EPIS, wurde von einer Häufung mit 34 Erkrankungen an EHEC O103:H2 von Ende November 2015 bis Anfang Februar 2016 in Schweden berichtet, wobei die Hälfte Kinder unter 5 Jahren waren.

Genomsequenzdaten von zwei Patienten-Isolaten aus Dänemark aus dem gleichen Zeitraum ergaben keinen Zusammenhang mit den schwedischen Isolaten. Im Vergleich mit den Sequenzdaten aus Schweden und Dänemark (zur Verfügung gestellt von C. Jernberg, Folkhälsomyndigheten, Solna, SWE, und von K. Grimstrup Joensen, Statens Serum Institut, Kopenhagen, DK) unterschieden sich die

deutschen Isolate in über 100 Positionen. Eine gemeinsame Infektionsquelle gilt somit als unwahrscheinlich.

Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, Kodama T, Abe H, Nakayama K, Kurokawa K, Tobe T, Hattori M, Hayashi T. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 2009 October 20; 106(42): 17939–17944.

## II.

### Netzwerk für Molekulare Surveillance von EHEC-Infektionen in Deutschland

*Angelika Fruth<sup>1</sup>, Rita Prager<sup>1</sup>, Christina Lang<sup>1</sup>, Wolfgang Rabsch<sup>1</sup>, Erhard Tietze<sup>1</sup>,  
Antje Flieger<sup>1</sup> und die Teilnehmer der Projektgruppe "German EHEC Molecular  
Surveillance Network"*<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, NRZ für Salmonellen und andere bakterielle  
Enteritiserreger, Burgstrasse 37, 38855 Wernigerode

<sup>\*</sup>LGL Oberschleißheim, NLGA Hannover, Landeslabor Berlin-Brandenburg, Regierungspräsidium  
Stuttgart, Landesuntersuchungsamt Landau, Labor Prof. Enders Stuttgart, Labor Wagner Stibbe  
Göttingen

**Schlüsselwörter:** EHEC, Molekulare Surveillance

Die molekulare Surveillance von Infektionserregern komplettiert die Surveillance von Infektionskrankheiten mit einem großen Spektrum an Methoden. Der Fortschritt in der Entwicklung neuer Diagnostikverfahren stellt dabei die Basis für die Nutzung dieser Methoden als Tool in der weiterführenden Typisierung und Analyse der Erreger dar. Insbesondere molekularbiologische Methodiken incl. der Sequenzierung der Genome der Infektionserreger liefern die Grundlage sowohl für die Verbesserung einer Beurteilung epidemiologisch bedeutsamer Situationen, als auch in der Prävention von Infektionskrankheiten.

Die schnelle Ausbruchserkennung und –aufklärung steht dabei im Vordergrund. In Zusammenarbeit mit den Einrichtungen des öffentlichen Gesundheitsdienstes (ÖGD), den Gesundheitsämtern und Landesstellen, sollen diese Verfahren angewendet und in das derzeit bestehende System der Erfassung meldepflichtiger Erkrankungen einfließen. Zur Implementierung wurde 2013 im Rahmen einer Pilotstudie ein Netzwerk für die molekulare Surveillance von EHEC-Infektionen mit Kooperationspartnern aus Landesstellen des ÖGD und Laboren der Primärdiagnostik unter Leitung des NRZ für Salmonellen und andere Enteritiserreger am RKI gebildet. Innerhalb dieser Kooperation wurden Verfahren zur Probenaufarbeitung, sowie neue Diagnostiktools erprobt und eingeführt. Im Zeitraum 2014/15 konnten 492 Isolate von Shiga Toxin-bildenden *E. coli* gewonnen und analysiert werden. Neben 127 Isolaten der Gruppe der besonders häufig menschliche Infektionen verursachenden Serovare

(O157:H7/H-, O26:H11, O103:H2, O145:H-, O111:H-), wurden einige seltene z.T. bisher in Deutschland nicht beobachtete Typen umfassend phänotypisch und molekular charakterisiert.

- [1] Struelens MJ, Brisse S.: From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases. Euro Surveill. 2013,24;18(4):20386.  
[2] Palm D, Johansson K, Ozin A, Friedrich A, Grundmann H, Larsson J, Struelens M. Molecular epidemiology of human pathogens: how to translate breakthroughs into public health practice, Stockholm, November 2011. Euro Surveill. 2012 Jan 12;17(2).

### III.

## **Hemolytic uremic syndrome in a 65 year-old male linked to a very unusual type of *stx2e* and *eae* harboring O51:H49 Shiga toxin producing *Escherichia coli***

*Fasel D*<sup>1</sup>, *Mellmann A*<sup>2</sup>, *Cernela N*<sup>3</sup>, *Hächler H*<sup>3</sup>, *Fruth A*<sup>4</sup>, *Khanna N*<sup>1</sup>, *Egli A*<sup>5</sup>,  
*Beckmann C*<sup>6</sup>, *Hirsch HH*<sup>1,6,7</sup>, *Goldenberger D*<sup>5</sup>, *Stephan R*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland, <sup>2</sup> Institute of Hygiene and the National Consulting Laboratory for Hemolytic Uremic Syndrome, University of Münster, Münster, Germany, <sup>3</sup> Institute for Food Safety and Hygiene, National Centre for Enteropathogenic Bacteria and Listeria, University of Zürich, Zürich, Switzerland, <sup>4</sup> Robert Koch Institute (RKI), Wernigerode, Germany, <sup>5</sup> Division of Clinical Microbiology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland, <sup>6</sup> Transplantation and Clinical Virology, Department Biomedicine Haus Petersplatz, University of Basel, Basel, Switzerland, <sup>7</sup> Division Infection Diagnostics, Department Biomedicine (Haus Petersplatz), University of Basel, Basel, Switzerland

The hemolytic-uremic syndrome (HUS), defined by the triad of microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure is in more than 90% of cases due to infection with Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and often presents with prodromal diarrhea.

Pathogenicity of STEC is associated with various virulence factors, the most important represent the Shiga toxins (Stxs). These toxins can be subdivided into two main groups, Stx1 and Stx2. STEC strains pathogenic for humans tend to feature Stx2 and additional virulence traits such as the adhesion factor intimin. Of the seven Stx2 variants described so far, the representatives of the Stx2acd group (*stx2a*, *stx2c*, *stx2d*), which are genetically closely related, are reported to be strongly associated with HUS in patients. The highly pathogenic subgroup of STEC that causes severe human disease is also called enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Recently, a collection of representative HUS-associated enterohemorrhagic *E. coli* (HUSEC) ([www.ehec.org](http://www.ehec.org)) was established.

We describe the case of a 65-year-old male patient presenting with HUS associated to a very unusual and new type of STEC, which is challenging for routine microbiological diagnostics. We propose integration of this type into the HUSEC database.

#### IV.

### **Characteristics of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains isolated during 2010-2015 from human infections in Switzerland**

*Nicole Cernela, Lisa Fierz, Herbert Hächler, Roger Stephan*

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

Shiga toxin–producing *Escherichia coli* (STEC) is among the most common causes of food-borne diseases. This organism is responsible for several human gastrointestinal illnesses, including nonbloody or bloody diarrhea. Especially in children, these diseases may be affected by neurologic and renal complications, including hemolytic uremic syndrome (HUS).

We characterized 140 Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients during 2010–2015 in Switzerland. Seventy-five strains were from female and 65 strains from male patients. 35 strains were isolated from patients  $\leq 5$  years old and 12 strains from patients  $\geq 70$  years old. The top 5 serogroups (O26 n=17; O103 n=11, O111 n=1, O145 n=12, and O157 n=20) accounted for 43.5% of the strains. The rest of the strains were distributed over a variety of serogroups. Nevertheless, 11 strains belonged to the serogroup O146. Sixty (42.9%) strains carried *stx2* genes only, 49 strains (35.0%) carried *stx1*, and 31 (22.1%) strains carried *stx1* and *stx2*. The *eae* gene encoding intimin was detected in 87 (62.1%) strains. MLST data, subtyping data for the *stx1* and *stx2* genes and the occurrence of further virulence factors will be presented.

## V.

### Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis lebensfähiger EHEC/EPEC

*Bianca Fröschle, Isabella Kinker, Michael Lebuhn*

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung für Qualitätssicherung und  
Untersuchungswesen, Lange Point 6, 85354 Freising

**Schlüsselwörter:** *Escherichia coli*, quantitative real-time PCR, MPN-qPCR

**Keywords:** *Escherichia coli*, quantitative real-time PCR, MPN-qPCR

DNA-basierte, molekularbiologische Methoden wie z.B. die quantitative real-time PCR (qPCR) ermöglichen einen schnellen und gleichzeitig sehr spezifischen Nachweis verschiedener Mikroorganismen. Bei DNA-basierten Verfahren kann jedoch nicht zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Kommen überwiegend tote Mikroorganismen in einer Probe vor, so wird der Anteil lebensfähiger Keime überschätzt. Ziel der Arbeit war es, eine schnelle Methode zu entwickeln, die eine Unterscheidung zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und nicht lebensfähiger enterohämorrhagischer bzw. enteropathogener *Escherichia coli* (EHEC/EPEC) ermöglicht, um ausschließlich lebende, vermehrungsfähige Keime zu quantifizieren. Hierfür wurde eine definierte Zellzahl EPEC LGL 38122 (*stx*-, *eae*+, *Ehly*+) in Keimträgern in Labor-Biogasfermentern mit Gärgemisch eingesetzt. Nach bestimmten Expositionszeiten wurde der Keimträgerinhalt entnommen und EHEC/EPEC mithilfe des spezifischen kultivierungsbasierten Verfahrens LFGB L07.18 angereichert. Die Kultivierung bestand aus drei Schritten: i) Voranreicherung in modifizierter Tryptose Soja Bouillon mit Novobiocin (mTSB+N), ii) Anreicherung in mTSB ohne Novobiocin-Zusatz, und iii) Ausstrich auf Endo-Agar. Die Kultivierung wurde in Log-Verdünnungsreihen und in Triplikaten durchgeführt, um eine Quantifizierung mithilfe des MPN-Verfahrens zu ermöglichen. qPCR Analysen (Zielgen Enterohämolysin (*ehly*)) wurden vor und nach der Voranreicherung, nach der Hauptanreicherung und von Zellsuspensionen der Kolonien auf Endo-Agar in sterilem Milli-Q-Wasser durchgeführt. Die Exposition des Stamms LGL 38122 gegenüber den Fermenterbedingungen bewirkte eine Abnahme seiner Lebendzellzahl in unterschiedlichem Ausmaß, wobei DNA aus lebenden und/oder toten Zellen messbar war. Verdünnungen der

Voranreicherungen ohne lebende Zellen ergaben kein qPCR-Signal wenn keine DNA durch die Verdünnung mehr vorhanden war oder wenn sie im Biogasprozess abgebaut worden war. Positive qPCR-Signale konnten auf Präsenz lebender oder toter Zellen beruhen. Dies wurde verifiziert durch den Vergleich des Werts ( $Cq[mTSB+N]$ ) nach der Inkubation gegenüber dem Wert aus mTSB+N vor der Inkubation ( $Cq[BI]$ ). Bei  $Cq[mTSB+N] - Cq[BI] \geq 0$  stammte die DNA aus toten Zellen, bei  $Cq[mTSB+N] - Cq[BI] < 0$  vermehrten sich Zellen.

Ein ähnlicher Ansatz war erfolgreich, wenn der Cq-Wert nach der Voranreicherung  $Cq[mTSB+N]$  nach der Inkubation in der Hauptanreicherung verglichen wurde  $Cq[mTSB]$ , wobei die Verdünnung 1:5 als +2,3 Cq-Werte einberechnet wurden. Die Spezifität wurde durch qPCR-Analysen auf Endo-Agar gewachsener Kolonien überprüft.

Mithilfe des neu entwickelten Schnellscreenings konnte zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und toter EHEC/EPEC-Zellen unterschieden und der Anteil lebensfähiger Keime durch die Anwendung der MPN-Statistik quantifiziert werden. Die Quantifizierung der Keime erfolgte innerhalb von 24 Stunden und war somit im Vergleich zur Referenzmethode ca. 1,5 Tage schneller.

## VI.

### Optimierte Induktion der Shiga Toxin-Expression in enterohämorrhagischen *Escherichia coli*

*Ting Guo, Wenlan Zhang, Helge Karch, Thorsten Kuczius*

Institut für Hygiene, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster  
Korrespondenzadresse: tkuczius@uni-muenster.de.

**Schlüsselwörter:** EHEC, Shiga Toxin, Stx, Proteinexpression, Induktion

**Keywords:** EHEC, Shiga toxin, Stx, protein expression, induction

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)-Bakterien sind durch die Produktion und Freisetzung von Shiga Toxinen (Stx) gekennzeichnet. Die klinische Symptomatik infizierter Patienten zeigt sich von wässrigen Durchfällen bis zur Entwicklung des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS).

EHEC werden sehr sensitiv durch Nachweis des Vorhandenseins der *stx*-Gene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) identifiziert. Allerdings wird bei Anwendung dieser Methodik der Lebenszustand der Bakterien nicht berücksichtigt. Lebende Mikroorganismen werden durch Kultivierung vermehrt, wobei die Toxinbildung in Immunoassays und die schädigende Wirkung mittels Zelltests nachgewiesen wird. Die Expressionsraten der Stx können jedoch durch Umweltfaktoren oder durch Zugabe von Induktionssubstanzen stark beeinflusst werden.

In der folgenden Studie wurden die Stx-Expressionsraten nach Zugabe des Induktors Mitomycin C in verschiedenen Konzentrationen und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten sowohl in Voll- als auch Minimalmedium untersucht. Die Toxin-Proteine wurden im Immunoblot mit Hilfe eines spezifischen Anti-Stx2-Antikörpers visualisiert, und die Signalintensitäten der Proteinbanden wurden computergestützt semi-quantitativ verglichen. Die höchsten Expressionsraten wurden nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden in Vollmedium mit der geringen Konzentration von 50 ng/ml Mitomycin C ermittelt. Eine Erhöhung der Induktorkonzentration bewirkte sogar eine Abnahme der Toxin-Signale.

In Minimalmedium dagegen wurden die höchsten Signale nach 12-stündiger Inkubation mit der hohen Konzentration von 2 µg/ml Mitomycin C bestimmt. Jedoch betrug die Signalstärke nur etwa 65% der Intensität nach Anzucht in Vollmedium.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Optimierung der Induktionsbedingungen eine maximale Toxin-Expression und somit ein sensitiver Nachweis der Stx-Proteine erzielt werden kann.

## VII.

### **Ringversuch zur Identifizierung von enterotoxischen und enterotoxämischen *Escherichia coli* des Schweines**

*Katharina Kerner, Anja Schwanitz und Rolf Bauerfeind*

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

Enterotoxische und enterotoxämische *E.coli* (ETEC bzw. EDEC) sind bei Schweinen weltweit verbreitet und verursachen im Aufzuchtbereich erhebliche wirtschaftliche Verluste. Die Isolierung von *E. coli* aus Darminhalt- oder Kotproben sowie die nachfolgende Zuordnung dieser Isolate zu den Pathovaren ETEC und EDEC anhand der jeweils charakteristischen Virulenzfaktoren bilden heute das Fundament der *E.coli*-Diagnostik beim Schwein. Diese ist wiederum Voraussetzung, damit in den betroffenen Betrieben erregerspezifisch und damit letztlich erfolgreich interveniert werden kann. Viele Labors haben entsprechende Typisierungsmethoden mittlerweile in ihre routinediagnostischen Abläufe integriert.

Zur Prüfung der Qualität dieser Methoden wurde deshalb ein Ringversuch unternommen, an dem 7 diagnostische Einrichtungen in Spanien, Portugal, Frankreich und Großbritannien teilnahmen. Dazu erhielt jedes Labor von uns 20 anonymisierte *E.coli*-Stämme zur Typisierung übersandt, die für die folgenden, taxonomisch relevanten Virulenzfaktoren entweder einzeln oder in unterschiedlicher Kombination kodierten: F4- (2 Stämme), F5- (1), F18- (9) und F41-Fimbrien (1) sowie die Toxine Stx2 (7), LT-I (4), ST-I (7) und ST-II (9). Drei Stämme kodierten für keinen dieser Faktoren.

Nur ein Labor schaffte es auf Anhieb, die Virotypen aller 20 Stämme vollständig und korrekt zu identifizieren. Im Gegensatz dazu konnte ein Labor den Virotyp bei keinem der Stämme vollständig bzw. korrekt bestimmen. Die Erfolgsquote der anderen Einrichtungen betrug 94,4 %, 88,8 %, 50 % und 22,2 %. Betrachtet man die Häufigkeit, mit der die bei den 20 Teststämmen vorhandenen Virulenzgene von den Laboren tatsächlich gefunden wurden, dann gelang der Nachweis bei den Genen für die F5-Fimbrien und das ST-I mit einer Trefferquote von 85,7 % und 83,7 % am besten und bereitete bei den Genen für die F41- und die F4-Fimbrien (jeweils 57,1 %) die größten Schwierigkeiten.

Die gemeinsame Fehleranalyse förderte folgende methodische Probleme zutage: fehlerhafte Zuordnung der PCR-Produkte anhand ihrer Position im Agarosegel wg. fehlender Molekulargewichtsmarker oder fehlender Referenz-Amplicons sowie irreführende unspezifische PCR-Produkte wegen ungeeigneter DNA-Polymerasen oder nicht hinreichend stringenter *Annealing*-Temperaturen. Nach ausführlicher Beratung konnten drei Labore ihre Methodik so deutlich verbessern, dass sie in einer zweiten Untersuchungsrunde ebenfalls alle Stämme korrekt identifizierten. Bei einem Labor gelang das erst nach wiederholter Beratung in der vierten Untersuchungsrunde.

Der Ringversuch deckt auf, dass es bei der Typisierung von ETEC- und EDEC-Isolaten erhebliche Qualitätsunterschiede zwischen den routinediagnostischen Einrichtungen gibt. Spezifische Beratungsangebote, Schulungen und Ringversuche scheinen demnach für die Sicherung der diagnostischen Qualitätsstandards unabdingbar zu sein.

## VIII.

### Effects of different media on the enrichment of low numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mungo bean sprouts and on the development of the sprout microbiome

H. Margot<sup>1</sup>, T. Tasara<sup>1</sup>, M. H. Zwietering<sup>2</sup>, H. Joosten<sup>3,4</sup>, R. Stephan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Food Safety and Hygiene, Vetsuisse Faculty University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland

<sup>2</sup>Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, 6700 AA Wageningen, the Netherlands

<sup>3</sup>European Chair in Food Safety Microbiology, Wageningen University, 6700 AA Wageningen, the Netherlands

<sup>4</sup>Imdea Food Institute, E-28049 Madrid, Spain

Sprouted seeds have been implicated in a number of serious outbreaks caused by *Salmonella* and Shiga toxin-producing *E. coli*. Sprouts pose a very complex challenge to bacterial pathogen enrichment and detection since they naturally contain high levels of background microflora including members of the *Enterobacteriaceae*. As such the currently used method cannot ensure reliable detection of STEC in sprouts.

In this study, we compared different media for the enrichment of *Enterobacteriaceae* in their ability to promote the growth of stressed STEC at 37°C and 42°C. Sprouted seeds were spiked with low levels of STEC and their growth was recorded over time. In addition, the microbiome of mungo bean sprouts was analysed before and after enrichment. Our results indicate that the growth of dry-stressed STEC is comparable in all of the tested enrichment media except for mTSB+Novobiocin and not influenced by the incubation temperature. Low levels of STEC spiked into the sprouts resuspended in media only grew to low levels during enrichment, which could reduce the probability of detection. *Proteobacteria* was the dominant phylum detected within the microbiome of non-enriched mungo bean sprouts. During enrichment in EE-broth *Proteobacteria* remained the most abundant phylum. In contrast, during enrichment in BPW the relative abundance of *Proteobacteria* decreased whereas *Firmicutes* increased when compared to the non-enriched mungo bean sprout microbiome. The microbiome composition was not significantly influenced by the incubation temperature during enrichment in both BPW and EE broths. This is the first study to examine the microbiome on sprouted mungo bean seeds during BPW and EE

enrichment and relates the bacterial community composition changes to the enrichment of pathogens.

## IX.

### **Besiedlungsstudie des Ausbruchsstammes EHEC O104:H4 (2011) von Bockshornkleesamen und Sprossen**

*Ingrid Huber<sup>1</sup>, Daniela Sebah<sup>1</sup>, Michael Rothballe<sup>2</sup>, Angelo Weiss<sup>1/2</sup>, Michael Schmid<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim, <sup>2</sup>Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Department für Umweltwissenschaften, Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

Für den EHEC Ausbruch in Deutschland 2011 mit dem Serotyp O104:H4 konnte importierter ägyptischer Bockshornkleesamen verantwortlich gemacht werden. Der unerwartete Anstieg der mit der Pflanzenprimärproduktion assoziierten Fälle von Infektionen mit EHEC in den letzten zwei Jahrzehnten bestärkt die Bedeutung der Pflanzen als alternatives Wirtssystem für diesen, aber auch viele andere humanpathogene Erreger. Prinzipiell stellt sich die Frage, ob es sich um rein pflanzenassoziierte Bakterien im Sinne einer Kontamination handelt oder ob es zu einer Kolonisation oder sogar einer Infektion der Pflanze und somit einer endophytischen Besiedlung kommen kann.

Der besonders aggressive EHEC-Stamm O104:H4 konnte von den Bockshornkleesamen oder Sprossen im Ausbruchsgeschehen nie isoliert werden. Bisher gibt es noch keine grundsätzlichen Erkenntnisse zur Aufnahme, Verteilung sowie Vermehrung und Persistenz von EHEC O104:H4 in Bockshornkleesamen/-sprossen.

In dieser Studie wird in Zusammenarbeit zwischen dem LGL und der Abteilung Mikrogen-Pflanzen Interaktionen des Helmholtz Zentrums München mit molekularbiologischen Methoden das Wachstumsverhalten von EHEC O104:H4 auf Bockshornkleesamen und während deren Sprossung verfolgt. Das Kolonisierungsverhalten des Ausbruchsstammes auf Wurzeln, der Transfer ins Pflanzengewebe und das Verweilen auf Bockshornkleesprossen sollen mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) an einem GFP-markierten (Green Fluorescent Protein) rekombinanten Stamm analysiert werden.

Dafür wurde bisher ein Versuchsmodell etabliert an dem in Bockshornklee die Besiedelung des O104:H4 Ausbruchsstammes untersucht werden kann. Zunächst wurden Bockshornkleesamen oberflächensterilisiert, einmalig mit dem O104:H4-

Ausbruchsstamm inokuliert und optimale Anzuchtbedingungen in Phytatrays ausgetestet. Nach vierwöchiger Kultivierung wurden die Pflanzen in Blätter, Spross, Wurzel und Samenhülle unterteilt und die einzelnen Pflanzenteile mittels real-time PCR auf das Vorhandensein von EHEC O104:H4 gescreent. In allen Bestandteilen konnte das Vorhandensein des Ausbruchstamms bestätigt und somit das Pflanzenmodell verifiziert werden. Zur weiteren Aufklärung der Besiedelung wurde das Pflanzenmaterial zusätzlich einer Behandlung zur Differenzierung von Epi- und Endophyten unterzogen. Nach Herstellung des GVOs durch Transposon-Mutagenese soll das Wachstums- und Kolonisierungsverhalten des GFP-markierten EHEC O104:H4 auf Bockshornkleesamen und während deren Sprossung mittels CLSM verfolgt werden. Aktuelle Ergebnisse werden vorgestellt.

## X.

### **Studien an Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC) der Serogruppen O27, O91 und O113 aus Human-, Rind-, Schaf- und Wildproben**

*Sabine Neubauer<sup>1</sup>, Mara Haubenwallner<sup>2</sup>, Margret Mandl<sup>1</sup>, Sabine Schlager<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Nationale Referenzzentrale und Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin-bildender *E. coli*, AGES, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Beethovenstraße 6, A-8010 Graz

<sup>2</sup>Universität für angewandte Naturwissenschaften, Biomedizin, Eggenberger Allee 13, A-8020 Graz

**Schlüsselwörter:** VTEC, Virulenzfaktoren, Tier, Lebensmittel, MLST

**Keywords:** VTEC, virulence factors, animal, food, MLST

**Einleitung:** Im Rahmen der Untersuchung von Wildfleisch- und Wildfleischprodukten im Österreichischen Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin-bildender *E. coli* wurden am häufigsten VTEC der Serogruppen O27, O91 und O113 isoliert. Diese Stämme wurden mit Isolaten aus Schaf- und Rinderproben, sowie Humanproben verglichen, um Infektionsketten aufzuklären.

**Material und Methoden:** Es wurden 16 VTEC O27 (human(7), Schaf(1), Wild(8)), 21 VTEC O91 (human (6), Rind (10), Schaf (3), Wild (2)) und 29 VTEC O113 (human (11), Rind (7), Schaf (9), Wild (2)) im Zeitraum von 2010-2012 analysiert.

Virulenzgene wurden mittels Microarrays (EC ArrayTube TM, Identibac) [1] und Shiga Toxin (*stx*)-Subtypen mittels PCR [2] analysiert. MLST wurde gemäß dem Protokoll von Wirth *et al.* [3] durchgeführt.

**Ergebnisse und Diskussion:** Im Zeitraum von 2010-2012 wurden im Zuge des österreichischen Monitoring- und Überwachungsprogramms für Zoonose-Erreger 442 VTEC Isolate von Rind und Schaf untersucht. VTEC O27 wurden lediglich einmal aus Schafkot isoliert, wohingegen acht von 142 VTEC-Wildisolaten zu dieser Serogruppe zählten. Alle diese Stämme, sowie auch alle humanen VTEC O27 waren vom gleichen Sequenztyp (ST753).

Es wurde eine klare Trennung zwischen VTEC O91, isoliert aus Rind (ST442) und jenen aus Schaf (ST33) beobachtet. Beide Sequenztypen wurden jedoch in VTEC O91, isoliert aus Wild und humanen Proben, nachgewiesen.

Es wurden folgende VTEC O113-Sequenztypen bei den Proben tierischen Ursprungs gefunden: ST10 in Schaf und Rind, ST56 und ST223 nur in Rind und ST2728 nur in Wild. Alle diese ST wurden auch in humanen Isolaten nachgewiesen.

**Folgerung:** Da alle ST von VTEC O27, O91 und O113, die in Wildproben vorkamen auch aus humanen Proben isoliert werden konnten, kann gefolgert werden, dass Wildtiere, neben Rindern und Schafen, auch ein mögliches Reservoir für humane Infektionen mit diesen drei Serogruppen darstellen.

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

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

[3] Wirth T, *et al.*: Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol. Microbiol. 2006, 60: 1136-1151

## XI.

### Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) in Faecesproben von Wildschweinen aus Polen

Nathalie Drees<sup>1</sup>, Rebecca Bonke<sup>1</sup>, Magdalena Twarużek<sup>2</sup>, Jan Grajewski<sup>2</sup>, Manfred Gareis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Ludwig-Maximilians-Universität München

<sup>2</sup>Department für Physiologie und Toxikologie, Universität Kazimierza Wielkiego Bydgoszcz, Polen  
Korrespondenz: drees@ls.vetmed.uni-muenchen.de

**Schlüsselwörter:** Wildschwein, STEC, *stx1/stx2*, *stx2e*, phylogenetische Gruppen

**Keywords:** wild boars, STEC, *stx1/stx*, *stx2e*, phylogenetic groups

Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) gehören zu den lebensmittel-assoziierten Zoonoseerregern, die neben Gastroenteritiden auch schwerwiegende Erkrankungsformen, wie hämorrhagische Kolitis oder das hämorrhagisch-urämische Syndrom, hervorrufen können. Erregerreservoir für STEC sind vor allem verschiedene Wiederkäuerarten (insbesondere Rinder), allerdings können auch Mast- und Wildschweine mögliche Träger von STEC sein.

Neben den Hauptgruppen-Toxinen Stx1 und Stx2 werden weitere Toxinvarianten unterschieden, wie beispielsweise Stx2e, das zur Ödemkrankheit der Schweine führen kann.

Innerhalb dieser Untersuchung wurden 46 Faecesproben von Wildschweinen, die innerhalb der Jagdsaison 2013-2014 in Polen erlegt wurden, auf das Vorkommen der *stx1-/stx2*- und *stx2e*-Gene mittels Real-Time PCR (EvaGreen<sup>®</sup>, Fa. BioRad) untersucht. Nach nicht-selektiver Anreicherung erfolgte die kulturelle Isolierung der positiven Proben auf Sorbitol-MacConkey Agar (SMAC), den chromogenen Nährmedien Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) und dem CHROMagar<sup>™</sup>STEC (Fa. Mast Diagnostica). Zusätzlich wurden die gewonnenen Isolate auf die Gene *hly*, *eae* und *saa* sowie die Zugehörigkeit zu den phylogenetischen Gruppen untersucht. Insgesamt konnten in 10 der 46 untersuchten Faecesproben (21,7 %) *stx1*- und/oder *stx2*-Gene molekularbiologisch nachgewiesen werden. Die Einzeluntersuchung auf die für die Ödemkrankheit ursächliche Toxinvariante Stx2e erbrachte in 2 von 46 Proben (4,3 %) einen positiven Nachweis. Bei der kulturellen Bestätigung konnte aus

vier der PCR-positiven Proben ein Isolat gewonnen werden (*stx2* (D<sub>1</sub>); *stx2e* (D<sub>2</sub>); *stx2* (B<sub>1</sub>); *stx2e* (D<sub>2</sub>)). Ein Isolat konnte der Serogruppe O145 zugewiesen werden. Das potentielle Risiko einer Verbreitung von Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli* über Faeces von Wildtieren wurde somit auch für polnische Wildschweine gezeigt. Darüber hinaus belegen die Ergebnisse, dass erlegte Tiere unter bestmöglichen hygienischen Bedingungen ausgeweidet und zerlegt werden sollten, um Kontaminationen von Wildschweinfleisch mit STEC zu vermeiden.

## XII.

### Genomsequenzierung von zwei neuen EHEC/EAEC Hybrid Stämmen aus menschlichen Infektionen

Christina Lang<sup>1</sup>, Rita Prager<sup>1</sup>, Angelika Fruth<sup>1</sup>, Erhard Tietze<sup>1</sup>, und Antje Flieger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Robert Koch-Institut, FG 11 Bakterielle darmpathogene Erreger und Legionellen, NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Burgstrasse 37, 38855 Wernigerode, (langc@rki.de)

Der *E. coli* O104:H4 Ausbruchsstamm von 2011 weist genetische Determinanten sowohl von enterohämorrhagischen (EHEC) als auch enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) auf. EHEC/EAEC Hybridstämme wurden bisher nur sehr selten beschrieben und besitzen ein hohes Virulenzpotential. Die EHEC Kollektion des Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger (NRZ) wurde auf das Vorkommen solcher Stämme bei menschlichen Infektionen untersucht.

Nach dem Ausschluss von O104:H4 EHEC/EAEC-Stämmen wurden aus über 2400 EHEC-Stämmen, die zwischen 2008 und 2012 an das NRZ gesandt wurden, zwei *eae*-negative Stämme mit Markergenen für EHEC (*stx2*) und für EAEC (*aatA*) detektiert. Einer der Stämme wurde 2010 von einem Patienten mit blutigem Durchfall isoliert und konnte dem Serotyp O59:H- zugewiesen werden. Des Weiteren gehört er dem seltenen MLST-Typ ST1136 an und besitzt Gene für Typ IV-aggregative Adhäsionsfimbrien (AAF) und *stx2a*. Ein weiterer Stamm, der im Jahr 2012 von einem Patienten mit Durchfall isoliert wurde, konnte als O147:H- bestimmt werden und weist den seltenen Sequenztyp ST26 und *stx2b* auf. Obwohl der Stamm aggregative Adhärenz zeigt, wurden keine Gene für AAF I–V detektiert<sup>[1]</sup>. Die beiden Hybridstämme wurden mittels PacBio und Illumina MiSeq Ganzgenomsequenzierung (GGS) vertiefend analysiert. Die Genomgröße beider Stämme beträgt ~5.2 Mb und es wurden jeweils 3-4 Plasmide mit einer Größe von 7-124 kb identifiziert, auf denen Virulenz- und Adhäsionsgene kodiert sind. Für den Stamm aus 2012 wurden auf dem pAA-Plasmid Gene gefunden, die für potentielle neue adhärenzvermittelnde Strukturen kodieren und den adhäsiven Phänotyp in Abwesenheit von AAF erklären könnten. Ähnliche Gene wurden in weiteren AAF I-V negativen EAEC gefunden. Die

GGs bestätigte die PCR-basierte Detektion von Virulenzgenen, ermöglichte den Nachweis weiterer Virulenzgene und die Zuweisung des O-Antigens auch bei den serologisch nicht typisierbaren Stämmen.

Das Kerngenom der beiden Stämme wurde mit anderen Stämmen des gleichen MLST Typs, dem Ausbruchstamm EHEC/EAEC O104:H4, EHEC O157:H7 EDL933 und EAEC O44:H18 042 verglichen. Stämme gleichen MLST Typs bildeten jeweils ein Cluster. Diese zeigten die höchste Identität zum Ausbruchstamm von 2011, eine verringerte zu O157:H7 EDL933 und die niedrigste Identität zu O44:H18 042.

[1] Prager R, Lang C, Aurass P, Fruth A, Tietze E, Flieger A. Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. PLoS One. 2014 Apr 21;9(4)

### XIII.

## Occurrence of uropathogenic and enteric pathogenic virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans

*Magdalena Nüesch-Inderbinnen, Andrea Müller, Roger Stephan*

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

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* isolates recovered from the following sources were characterized with regard to the occurrence and distribution of uropathogenic and enteric pathogenic virulence factors: surface waters (rivers and lakes, n=60), the intestines of freshwater fish (n= 33), fresh vegetables (n=26 ), retail poultry meat (n= 13) and the fecal samples of livestock (n= 28), healthy humans (n= 34) and primary care patients (n=13).

Among the 207 isolates, 82% tested positive by PCR for one or more of the virulence factors (VF) that predict uropathogenicity, *TraT*, *fyuA*, *chuA*, PAI, *yfcv* or *vat*.

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) were detected in each of the analyzed sources. Regarding virulence factors for intestinal pathogenic *E. coli*, these were found more rarely and predominantly associated with the aquatic environment, with *aagR* (EAEC) found in isolates from surface waters and STp (porcine heat stable enterotoxin) and LT (heat-labile enterotoxin) associated with isolates from fish.

Aggregate VF scores (the number of unique virulence factors detected for each isolate) were lowest among isolates belonging to phylogenetic group B1 and highest among group B2. Clustering of the isolates by phylogenetic group, multilocus sequence type (MLST) and ESBL-types revealed clonal overlaps of A:ST10 (CTX-M-1) and D:ST350 (CTX-M-1) between the sources of livestock, poultry meat and healthy humans, suggesting livestock, in particular poultry, represents a potential reservoir for these particular UPEC clones.

The clones A:ST10 (CTX-M-55) and B2:ST131 (CTX-M-27), harbouring uropathogenic virulence factors were significantly associated with fresh vegetables and with fish, respectively. Further clonal complexes with source overlaps included

D:ST38 (CTX-M-14), D:ST69 (CTX-M-15), D:ST405 (CTX-M-15) and D:ST648 (CTX-M-15), which were found in surface water and healthy humans. Identifying potential reservoirs of UPEC in the environment, animals, food and humans is important in order to assess routes of transmission and risk factors for acquiring UPEC.

## XIV.

### The accessory genome correlates with the colonization type of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) of bovine origin

Stefanie A. Barth<sup>1</sup>, Christian Menge<sup>1</sup>, Inga Eichhorn<sup>2</sup>, Torsten Semmler<sup>2,3</sup>, Lothar H. Wieler<sup>2,3</sup>, Derek Pickard<sup>4</sup>, Lutz Geue<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Loeffler-Institut/Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Germany

<sup>2</sup> Freie Universität Berlin, Institute of Microbiology and Epizootics, Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin, Germany

<sup>3</sup> Robert Koch Institute, Seestraße 10, 13353 Berlin, Germany

<sup>4</sup> Wellcome Trust Sanger Institute, Pathogen Genomics, Hinxton, Cambridge, UK

**Keywords:** STEC, bovine, microarray, MLST, genoserotype

Some Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains can colonize cattle for several months and may thus serve as gene reservoir for the genesis of highly virulent zoonotic enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). Any attempt to reduce the human risk for acquiring EHEC infections should include strategies to control such STEC strains persisting in cattle. We therefore aimed at identifying genetic patterns associated with the STEC colonization type in the bovine host.

We included 88 persistent (pSTEC, shedding  $\geq$  4 months) and 74 sporadically colonizing STEC (sSTEC, shedding  $\leq$  2 months) isolates from cattle and 16 bovine STEC isolates with unknown colonization types. Genoserotype and MLST were determined by whole genome sequencing and the isolates were probed with DNA microarray for virulence-associated genes (VAGs).

All pSTEC belonged to only four genoserotypes (O26:H11, O156:H25, O165:H25, O182:H25) which formed three clonal clusters (ST21/396/1705, ST300/688, ST119). On the contrary, sSTEC were scattered to 28 genoserotypes and 30 MLST types with O157:H7 (ST11) and O6:H49 (ST1079) being the most prevalent. The microarray analysis identified 139 unique gene patterns that clustered with the genoserotypes and MLST types of the strains.

While the pSTEC isolates in our study possessed heterogeneous phylogenetic backgrounds, the accessory genome clustered those isolates together, separating them from sSTEC. Given the vast genetic, and consequently antigenic, heterogeneity

**EHEC-Workshop 2016**  
Nördlingen, 8.-10. Juni 2016

of bovine STEC strains, definition of genetic pattern distinguishing pSTEC from sSTEC will facilitate the targeted design of vaccines counteracting these zoonotic pathogens at farm level.

This study was funded by the German Research Foundation (DFG).

## XV.

### Switching the O-antigen gene cluster in *Escherichia coli* – an opportunity for STEC to persist longer in cattle?

Lutz Geue<sup>1</sup>, Christian Menge<sup>1</sup>, Inga Eichhorn<sup>2</sup>, Torsten Semmler<sup>2,3</sup>, Lothar H. Wieler<sup>2,3</sup>, Derek Pickard<sup>4</sup>, Christian Berens<sup>1</sup>, Stefanie A. Barth<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Friedrich-Loeffler-Institut/Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Molecular Pathogenesis, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Germany

<sup>2</sup>Free University Berlin, Institute of Microbiology and Epizootics, Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin, Germany

<sup>3</sup>Robert Koch Institute, Seestraße 10, 13353 Berlin, Germany

<sup>4</sup>Wellcome Trust Sanger Institute, Pathogen Genomics, Hinxton, Cambridge, UK

**Keywords:** STEC, bovine, NGS, MLST, O antigen gene cluster

Cell-surface polysaccharides are targets for host immune responses limiting the ability of bacteria to survive and persist in their hosts. The O-antigen polysaccharide constitutes the outermost part of the lipopolysaccharide layer. In *E.coli*, the O-antigen biosynthesis gene cluster is flanked by the *wca* gene and the *his* operon. In this study, we compared the whole genome sequence data of three STEC/EPEC strains isolated from cattle with special reference to their O-antigen gene clusters.

The entire genomes of two STEC strains with identical MLST-ST 300, but different O-serogroups (O182:H25 and O156:H25) and an outgroup O156:H8 EPEC strain were sequenced by the PacBio system, assembled and completely annotated. The three strains were isolated from the same farm during the same period.

The high correlation in MLST-ST of O182:H25 and O156:H25 was mirrored in the analysis of core genome and virulence-associated genes. The genes of the Stx-bacteriophage (Stx1a), the genes of the complete LEE locus including  $\zeta$ -Intimin and the flagellar and chemotaxis genes were close to identical in their nucleotide sequences. Instead, fundamental differences were discovered in the O-antigen gene cluster sequences in the region between the *wca* gene and the *his* operon. In contrast, the O-antigen gene clusters of the O156:H8 and O156:H25 strains were sequence-homologous, but significant differences were detected in the remaining genome including the virulence gene patterns.

The results imply that specific STEC strains replace their O-antigen gene cluster in short time scales to change their phenotype and to evade the host immune response, possibly to improve their persistence.

This study was funded by the German Research Foundation (DFG).

## XVI.

### ***N*-Acylglukosamin-Derivate verändern die Glykosphingolipid-Expression und damit das Repertoire an Shiga Toxin-Rezeptoren von humanen Epithelzellen**

*Kevin-André Jarosch, Gottfried Pohlentz, Helge Karch, Johannes Müthing*

Institut für Hygiene, Universität Münster, Robert-Koch-Straße 41, D-48149 Münster,  
E-Mail: [Kevin-Andre.Jarosch@ukmuenster.de](mailto:Kevin-Andre.Jarosch@ukmuenster.de)

**Schlüsselwörter:** Shiga Toxin, Glykosphingolipide, Aminozucker-Derivate

**Keyword:** Shiga toxin, glycosphingolipids, amino sugar derivatives

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind weltweit für schwere Durchfallerkrankungen, hämorrhagische Colitis und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verantwortlich. Shiga Toxin (Stx), der Hauptvirulenzfaktor von EHEC und maßgebliche Ursache für die Manifestation eines HUS, bindet spezifisch an Glykosphingolipide (GSL) der Globo-Serie. Diese befinden sich beim Menschen in hoher Konzentration in der äußeren Schicht der Plasmamembran, insbesondere von mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns und der Nieren [1]. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass Epithelzellen des Darms ebenfalls Stx-Rezeptoren aufweisen und somit von Stx geschädigt werden können. Die Möglichkeit, den Gehalt an GSL-Rezeptoren von Stx-sensitiven Zellen in einem Zellkulturmodell *in vitro* regulieren bzw. steuern zu können, eröffnet neue Strategien zur Milderung der von den unterschiedlichen Stx-Subtypen verursachten Epithelschädigungen.

In dieser Studie wurde der Einfluss von Glukosamin (GlcN)-Derivaten mit unterschiedlichen Alkylseitenketten auf die Expression der Stx-GSL-Rezeptoren Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer) von Stx-sensitiven humanen Darmepithelzelllinien untersucht. In Zellkulturtests konnte vorab gezeigt werden, dass die synthetisierten *N*-Acylglukosamin-Derivate keine zytotoxische Wirkung auf die verwendeten Epithelzellen aufwiesen. Nach Inkubation der Zellen mit den modifizierten Aminozuckern wurden die GSL aus den Lipidextrakten isoliert und die Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer zunächst nach

dünnschichtchromatographischer Auftrennung und anschließenden Überschichtungsassays mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Die verschiedenen Lipoformen, basierend auf Heterogenitäten im Ceramid-Part der GSL, wurden mittels Massenspektrometrie strukturell charakterisiert. Die densitometrische Quantifizierung der immunpositiven GSL-Banden ergab, dass in Abhängigkeit des jeweils verwendeten *N*-acylmodifizierten Aminosuckers einerseits eine Zunahme, andererseits aber auch eine Abnahme des Stx-Rezeptorgehaltes im Vergleich zu Kontrollkulturen ohne die Aminosuckerderivate nachgewiesen werden konnte. Somit erlaubt die Verwendung von Zuckerderivaten insbesondere eine Verringerung des Rezeptorgehaltes von Stx bei Darmepithelzellen.

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

## Referenten und Moderatorenverzeichnis

### A, B

Barth, Dr. Stefanie

Friedrich-Löffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese  
Naumburger Straße 96 a, 07433 Jena

Bauerfeind, Prof. Dr. Rolf

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

Bauwens, Dr. Andreas

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

Berger, Dr. Michael

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

Berger, Dr. Petya

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

Beutin, PD Dr. Lothar

Freie Universität Berlin, Institut für Biologie - Mikrobiologie  
Königin-Luise-Str. 12-16, 14195 Berlin

Busch, Dr. Ulrich

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

### C

Cernela, Nicole

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

### D

Dobrindt, Prof. Dr. Ulrich

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

Drees, Nathalie

Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit  
Schönleutnerstraße 8, 85764 Oberschleißheim

**E, F**

Fasel, Dr. Dominique

Universitätsspital Basel, Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology  
Spitalstraße 21, CH-4056 Basel, Schweiz

Fruth, Dr. Angelika

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

Funk, Joschua

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

Fröschle, Bianca

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung für Qualitätssicherung und  
Untersuchungswesen  
Lange Point 6, 85354 Freising

**G**

Geue, Dr. Lutz

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

Guo, Ting

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

**H**

Hauser, Dr. Elisabeth

Bundesinstitut für Risikobewertung,  
Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich Verotoxin-bildende *E. coli*  
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Huber, Bettina

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung für Qualitätssicherung und  
Untersuchungswesen  
Lange Point 6, 85354 Freising

Huber, Dr. Ingrid

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

**I, J**

Jarosch, Kevin-André

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

**K**

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

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

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Kerner, Katharina

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

Frankfurter Straße 85-89, 35392 Gießen

Konrad, Dr. Regina

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Kouzel, Dr. Ivan U.

Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

Kuczus, Prof. Dr. Thorsten

Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

**L**

Lang, Christina

Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, NRZ für Salmonellen und andere bakterielle  
Enteritiserreger

Burgstrasse 37, 38855 Wernigerode

Legros, Nadine

Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

**M**

Margot, R. H.

Universität Zürich, Institut für Lebensmittelsicherheit und Hygiene

Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zürich, Schweiz

Menge, Prof. Dr. Christian

Friedrich-Löffler-Institut, Institut für molekulare Pathognese

Naumburger Straße 96 a, 07433 Jena

Müthing, Prof. Dr. Johannes

Universitätsklinikum Münster, Institut für Hygiene

Robert-Koch-Str. 41, 48149 Münster

**N**

Neubauer, Sabine

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

Beethovenstr. 6, A-8010 Graz

## **EHEC-Workshop 2016**

Nördlingen, 8.-10. Juni 2016

Nüesch-Inderbinen, Dr. Magdalena

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

### **O**

Orth-Höller, Dr. Dorothea

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

### **P**

Peier, Dr. Martin

Kantonales Labor Zürich, Mikrobiologie  
Fehrenstrasse 15, CH-8032 Zürich

Putze, Dr. Johannes

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

### **Q, R**

Rentsch, Dr. Jürg

Swiss Quality Testing Services  
Rue l'Industrie 61, CH-1784 Courtepin

Rubin, Dr. Dennis

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

### **S**

Saile, Nadja

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

Schierack, Prof. Dr. Peter

BTU Cottbus-Senftenberg, Institut für Biotechnologie  
Großenhainer Str. 57, 01968 Senftenberg

Schlager, Dr. Sabine

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

Schmidt, Prof. Dr. Herbert

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

Sing, Prof. Dr. Dr. Andreas

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

Stark, Prof. Dr. Klaus

Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionsepidemiologie  
Nordufer 20, 13353 Berlin

Steil, Daniel

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

Stephan, Prof. Dr. Dr. h. c. Roger

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

### **T, U, V**

Toikkanen, Salla

Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Roesebeckstraße 4-6, 30449 Hannover  
European Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET), European Centre for  
Disease Prevention and Control, (ECDC), Granits Väg 8, 17165 Solna - Sweden

### **W**

Würzner, Prof. Dr. Dr. Reinhard

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

### **X, Y, Z**

Zapf, Dr. Andreas

Präsident des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)  
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

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

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

II. EHEC Workshop 2007, Wildbad Kreuth 9.-11. Mai 2007

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

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

**sowie der vorliegende Band**

V. EHEC Workshop 2016, Nördlingen 8.-10. Juni 2016

**Bayerisches Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit**

Telefon: 09131 6808-0  
Telefax: 09131 6808-2202  
Internet: [www.lgl.bayern.de](http://www.lgl.bayern.de)  
E-Mail: [poststelle@lgl.bayern.de](mailto:poststelle@lgl.bayern.de)

**91058 Erlangen**  
Eggenreuther Weg 43

**85764 Oberschleißheim**  
Veterinärstraße 2

**80538 München**  
Pfarrstraße 3

**97082 Würzburg**  
Luitpoldstraße 1

**90441 Nürnberg**  
Schweinauer Hauptstr. 80

**91126 Schwabach**  
Rathausgasse 4