

**Biodiversität der O- und H-Antigene von *Escherichia coli* :
serologische und molekulare Identifizierung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Biochem. Angelika Fruth

geboren am 01.07.1961 in Elbingerode

Gutachter bzw. Gutachterin:

1. Prof. Dr. rer. nat. H. Karch (Westfälische Wilhelms-Universität Münster)
2. Prof. Dr. rer. nat. J. R. Andreesen (Martin-Luther-Universität Halle)

Halle (Saale), den 13. 10. 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009394

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009394>]

Zusammenfassung

Mit Hilfe eines „Mikrotiter-Agglutinationsassay“ und eigen hergestellter Testseren, sowie der Einhaltung optimaler Kulturbedingungen für die Bildung der O- und H-Antigene von *E. coli* wurde eine Standard Operation Procedure (SOP) erstellt und an 235 Referenzstämmen für die Serotypie dieser Antigene der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, sowie 4431 *E. coli* -Isolaten der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, D, erprobt.

Diese SOP wurde als wissenschaftlich gesichert in der Routinediagnostik des NRZ, sowie in Ringversuchen (EQA) erfolgreich eingeführt. Die Ergebnisse der standardisierten Serotypie wurden mit molekularen Techniken überprüft. Dazu kam die Analyse der LPS-Muster für die Bestimmung der O-Antigene und der *fliC*-PCR-RFLP für die H-Antigene zur Anwendung. Es konnte mit der molekularen Erfassung der LPS- und der *fliC*-Polymorphismen bestätigt werden, dass die Serotypie sichere und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Daher bleibt die Serotypie als „Gold-Standard“ der epidemiologischen Subdifferenzierung sozusagen als Klassenmerkmal von *E. coli* bestehen und nimmt einen ähnlichen Rang ein wie die Serotypie von *Salmonella enterica*.

Mit Hilfe der angewendeten molekularen Techniken konnten darüber hinaus neue O- und H-Antigene charakterisiert und beschrieben werden. Durch Herstellung von entsprechenden Testseren ließen sich diese neuen Serotypen serologisch bestätigen.

Summary

By means of a „microtiter agglutination assay” and the application of a panel of own produced antisera which are specific for the detection of the *E. coli* antigens of O1- O181 and H1- H56, respectively, an standard operation procedure (SOP) for serotyping of strains of this species was established. Serotyping results achieved with this SOP at 235 reference strains of the strain collection for serotyping at the WHO Centre for *Klebsiella* and *E. coli*, Copenhagen, DK, and 4431 strains of *E. coli* from clinical specimens of the strain collection of the NRC for Salmonella and other enterics, Robert Koch Institute, Germany. These results were compared with the respective molecular data. These data were achieved with the LPS pattern analysis for O antigens and *fliC*-PCR-RFLP for the H antigens. The observations allow the conclusion that the phenotypical serotyping results are in good agreement with the molecular data. Therefore, serotyping remains the “Golden Standard” for subtyping of *E. coli* strains for epidemiological purposes and can be applied diagnostically similar to serotyping of *Salmonella enterica*, as a quasi taxonomic property. Moreover, by means of LPS pattern analysis and *fliC*-PCR-RFLPs new serotypes have been identified. By application of respective antisera they were confirmed as new serotypes.

Inhalt

| | | Seite |
|-------------|--|--------------|
| | Inhaltsverzeichnis | I-IV |
| | Tabellenverzeichnis | V |
| | Abbildungsverzeichnis | VII |
| | Verzeichnis des Anhangs | IX |
| | Abkürzungen | XII |
| | | |
| 1. | Einleitung | 1 - 9 |
| | | |
| 2. | Problemstellung | 10 |
| | | |
| 3. | Material und Methoden | 11-29 |
| 3.1. | Bakterienstämme | 11 |
| 3.1.1. | Referenzstämme für <i>E. coli</i> O-Antigene | 11 |
| 3.1.2. | Referenzstämme für <i>E. coli</i> H-Antigene | 11 |
| 3.1.3. | Klinische Stämme von <i>E. coli</i> - Infektionen | 11 |
| 3.1.4. | <i>E. coli</i> -Stämme aus Ringversuchen (EQA) | 12 |
| 3.2. | Medien | 12 |
| 3.2.1. | Nährmedien für die biochemische Charakterisierung | 12 |
| 3.2.2. | Nährmedien und Chemikalien für die Isolierung der O-Antigene | 12 |
| 3.2.3. | Nährmedien und Chemikalien für die Isolierung der H-Antigene | 12 |
| 3.2.4. | Nährmedien und Chemikalien für die LPS-Präparation | 13 |
| 3.3. | Anzucht der Stämme | 13 |
| 3.3.1. | Beweglichkeit | 13 |
| 3.3.2. | Sauerstoffmangel | 14 |
| 3.3.3. | Temperatur | 14 |
| 3.4. | Biochemische Charakterisierung der Isolate | 15 |
| 3.5. | Herstellung und Prüfung der Testseren zur Erfassung von <i>E. coli</i>-O- und H-Antigenen | 15 |
| 3.5.1. | Antigen-Präparation | 15 |
| 3.5.1.1. | O-Antigene | 15 |
| 3.5.1.2. | H-Antigene | 16 |

| | | |
|--------------|--|--------------|
| 3.5.2. | Immunisierung | 16 |
| 3.5.3. | Serumgewinnung | 17 |
| 3.5.4. | Testung der Seren mit den homologen Stämmen und dem Referenzset | 18 |
| 3.5.5. | Kommerziell verfügbare Seren | 18 |
| 3.6. | Serologische Testung von <i>E. coli</i>-O- und H-Antigenen im Mikrotiterplatten-Assay | 19 |
| 3.6.1. | O-Antigen-Bestimmung | 19 |
| 3.6.1.1. | Poolseren | 19 |
| 3.6.1.2. | Agglutination | 21 |
| 3.6.2. | H-Antigen-Bestimmung | 22 |
| 3.6.2.1. | Poolseren | 22 |
| 3.6.2.2. | Agglutination | 23 |
| 3.7. | LPS-Musteranalyse | 23 |
| 3.7.1. | Präparation der LPS | 23 |
| 3.7.2. | Elektrophorese | 24 |
| 3.7.2.1. | Präparation der SDS-PAGE-Gele | 24 |
| 3.7.2.2. | Laufbedingungen | 25 |
| 3.7.2.3. | Färbung der Gele | 26 |
| 3.7.2.4. | Auswertung der Gele | 26 |
| 3.7.3. | Computergestützte Ermittlung des Molekulargewichts der LPS-Banden | 26 |
| 3.7.3.1. | Ermittlung der Rf-Werte der LPS-Muster | 26 |
| 3.7.3.2. | Molekulargewicht der Repeating unit (RU) | 28 |
| 3.8. | PCR und RFLP des <i>fliC</i>-Gens | 29 |
| 3.9. | Biostatistik | 29 |
| 3.10. | Chemikalien | 29 |
| 3.11. | Geräte | 29 |
| 4. | Ergebnisse | 30-88 |
| 4.1. | O-Antigene | 30 |
| 4.1.1. | Ausbildung der O-Antigene | 30 |
| 4.1.2. | Optimale Keimkonzentration | 30 |
| 4.1.3. | Herstellung der Testseren | 32 |
| 4.1.4. | Charakterisierung der Kreuzreaktivität | 32 |
| 4.1.5. | Anwendung kommerzieller Testseren zur O-Antigen-Bestimmung | 35 |
| 4.1.6. | Molekulare Charakterisierung mittels LPS-Musteranalyse | 38 |

| | | |
|-------------|---|---------------|
| 4.1.6.1. | Ermittlung der LPS-Muster der Referenzstammsammlung | 38 |
| 4.1.6.2. | Vergleich der LPS-Muster serotypisch kreuzreaktiver O-Antigene | 46 |
| 4.1.6.3. | Vergleich der LPS-Muster serotypisch identischer O-Antigene | 48 |
| 4.1.6.4. | Ermittlung von Schwankungsbreiten bei der Erstellung der LPS-Muster | 49 |
| 4.1.6.5. | Ermittlung von Schwankungsbreiten für die RU-Werte für <i>E. coli</i> -Isolate identischer Serotypen | 50 |
| 4.1.6.6. | Betrachtung der LPS-Muster des <i>E. coli</i> Serovars O157 der Pathovare EHEC, EPEC und ETEC | 52 |
| 4.1.6.7. | Überprüfung der Eignung von Alternativmethoden für die Darstellung der LPS-Muster | 53 |
| 4.1.6.8. | LPS-Muster von nicht typisierbaren Serotypen (Ont) | 54 |
| 4.2. | H-Antigene | 58 |
| 4.2.1. | Ausbildung der H-Antigene | 58 |
| 4.2.1.1. | Schwärmverhalten von <i>E. coli</i> bei Variation der Temperaturbedingungen | 58 |
| 4.2.1.2. | Schwärmverhalten unter anaeroben Inkubationsbedingungen | 60 |
| 4.2.2. | Serologische Charakterisierung | 61 |
| 4.2.3. | Herstellung der Testseren | 63 |
| 4.2.4. | Charakterisierung der Kreuzreaktivität | 64 |
| 4.2.5. | Molekulare Charakterisierung | 64 |
| 4.2.5.1. | PCR des <i>fliC</i> -Gens von <i>E. coli</i> -Referenzstämmen | 64 |
| 4.2.5.2. | PCR des <i>fliC</i> -Gens von <i>E. coli</i> -Stämmen aus Patientenisolaten | 71 |
| 4.3. | Standard Operation Procedure (SOP) | 74 |
| 4.4. | Anwendung bei epidemiologischem Material | 85 |
| 5. | Diskussion | 89-106 |
| 5.1. | Entwicklung einer SOP und Absicherung durch Analyse der molekularen Grundlagen | 89 |
| 5.1.1. | Bedeutung einer SOP für die Serotypie von <i>E. coli</i> | 89 |
| 5.1.2. | Bedeutung der LPS-Muster für die Absicherung der Serotypie und die Beschreibung neuer Serovare von <i>E. coli</i> | 96 |
| 5.1.3. | Bedeutung der <i>fliC</i> -PCR für die Absicherung der Serotypie und die Beschreibung neuer Serovare von <i>E. coli</i> | 99 |
| 5.2. | Molekulare Grundlagen der Serotypie | 100 |
| 5.2.1. | Polysaccharidstruktur und Serotypie | 100 |
| 5.2.2. | Molekulare Grundlagen der nicht typisierbaren Stämme (O rau, Ont, Hnt) | 101 |

| | | |
|---------------|---|----------------|
| 5.3. | Epidemiologische Bedeutung der Serotypie | 103 |
| 6. | Schlussfolgerungen | 107-108 |
| 7. | Literatur | 109-117 |
| Anhang | | 1-54 |

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Immunisierungsschema für O-Antigene
- Tabelle 2: Immunisierungsschema für H-Antigene
- Tabelle 3: Kommerziell verfügbare Seren
- Tabelle 4: O-Antiserum-Pools
- Tabelle 5: H-Antiserum-Pools
- Tabelle 6: Pipettierschema für die Herstellung der SDS-Gele
- Tabelle 7: PCR-Primer zur Verwendung in der *fliC*-PCR
- Tabelle 8: Einfluß von KBE auf die Titerstufen bei der serotypischen Identifizierung von *E. coli*-Stämmen
- Tabelle 9: Vergleich von Serotypie-Ergebnissen kapseltragender *E.coli*-Isolate und ihren isogenen kapselfreien Formen
- Tabelle 10: Kreuzreagierende Antiseren aus dem Testserum-Set des NRZ
- Tabelle 11: Häufig aufgetretene Kreuzreaktionen bei *E. coli*-Isolaten aus Patientenmaterial
- Tabelle 12: Anwendung kommerziell verfügbarer Testseren (Fa. SIFIN GmbH Berlin, D) im Mikrotiterplattenassay zur O-Antigenbestimmung von *E. coli*
- Tabelle 13: RU-Werte (in kDa) der Stämme aus der Referenzstammsammlung für *Escherichia coli* mit den dazugehörigen Rf-Werten der LPS-Muster nach SDS-PAGE
- Tabelle 14: RU-Werte der *E. coli*-O-Typ-Referenzstämme repräsentativ für mehrere O-Antigene
- Tabelle 15: Gruppen kreuzreagierender Serovare und deren RU-Werte in kDa
- Tabelle 16: Schwankungsbreiten für die RU-Werte (in kDa) bekannter *E. coli*-Serovare
- Tabelle 17: Neue Serovare
- Tabelle 18: RU-Werte (in kDa) der *E. coli* Ont-Serovare
- Tabelle 19: Biochemische Charakterisierung nach FARMER für die Isolate des Serovars *E. coli* Ont:H18
- Tabelle 20: Ermittlung der Swarming distance (SD) in mm pro Tag für *E. coli*- Isolate aus Einsendungen an das NRZ bei Inkubation mit 30°C bzw. 37°C
- Tabelle 21: Ermittlung der Swarming distance (SD) in mm nach 7 Tagen für *E. coli*- Isolate aus Einsendungen des NRZ bei aeroben und anaeroben Inkubationsbedingungen bei 37°C

- Tabelle 22: Serotypische Überprüfung von non-motilen *E.coli*-Stämmen durch Prüfung mehrerer Einzelkolonien
- Tabelle 23: Polymorphismus der PCR-Produkte von *fliC* nach FIELDS (*fliCF*) und MACHADO (*fliCM*) und ihre Korrelation mit serotypisch ermittelten H-Antigenen und den mit diesen H-Antigenen kombinierten O-Antigenen (nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)
- Tabelle 24: Serotypisch definierte H-Antigene mit mehreren *fliC*-RFLP-Mustern (nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)
- Tabelle 25: *fliC*-RFLP-Muster mit mehreren serotypisch definierten H-Antigenen (nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)
- Tabelle 26: Überprüfung von *E. coli*-Isolaten aus Patientenmaterial ohne H-Antigen (H⁻) bzw. mit schwer identifizierbarem H-Antigen (H^{nt}) oder mit H-Antigenen, welche den „mismatching“-Komplexen nach der *fliC*-PCR angehörten (nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)
- Tabelle 27: Ringversuch-Stämme für die Serotypie, bearbeitet im europäischen Netzwerk EnterNet der Jahre 2002 und 2003
- Tabelle 28: Auflistung der Serovare aus Einsendungen an das NRZ im Jahr 2004 mit einer Häufigkeit unter 2%
- Tabelle 29: Serovarverteilung der *E. coli*-Isolate aus Einsendungen an das NRZ von 1998-2004

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau der Zellwand gram-negativer Bakterien
- Abbildung 2: Flagellenapparat von *E. coli*
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der LPS-Struktur gram-negativer Bakterien
- Abbildung 4: Beweglichkeitsprüfung mittels U-Röhrchen
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der *E. coli*-O-Antigentestung im MTP-Assay für ein *E. coli* O26-Isolat
- Abbildung 6: Standards für die Auswertung der LPS-SDS-PAGE
- Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ermittlung von Rf- und MW-Werten
- Abbildung 8: Densitogramm der LPS-Muster von 3 *E. coli* Ont:H- Isolaten (nach HECKE, 2004)
- Abbildung 9: Anteil von *E. coli*-Isolaten mit kreuzreagierenden Antigenen aus Routineeingängen des NRZ in den Jahren 2000-2003
- Abbildung 10: LPS-Muster einiger *E. coli*-O-Typstämme der Referenzstammsammlung
- Abbildung 11: Vergleich kreuzreagierender O-Serotypen
- Abbildung 12: LPS-Muster von *E. coli* O1-Stämmen
- Abbildung 13: Darstellung der Abweichung der RU-Werte vom homologen Mittelwert des entsprechenden Serovars (n=222)
- Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Abweichungen der Einzelwerte von den RU-Mittelwerten
- Abbildung 15: LPS-Muster von *E. coli* O157-Isolaten verschiedener Pathovaren
- Abbildung 16: LPS-Präparation von *E. coli* O91- Isolaten durch Schnellaufschluß nach HITCHCOCK et al. (1983)
- Abbildung 17: LPS-Präparation von *E. coli* O91- Isolaten durch Phenol-Wasser-Extraktionsmethode nach WESTPHAL et al. (1965)
- Abbildung 18: LPS-Muster von *E. coli* OX187:H18-Stämmen, RU-Werte in kDa und Charakterisierung der Virulenzeigenschaften
- Abbildung 19: PCR-Produkte einiger serotypisch definierter H-Antigene von *E. coli*

- Abbildung 20: *fliC*-Typen nach der Methode von MACHADO et al. (2000)
- Abbildung 21: Standard Operation Procedure (SOP) für die Serotypie der O- und H-Antigene von *Escherichia coli*
- Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der *E. coli*-Serovare aus Einsendungen an das NRZ im Jahre 2004
- Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der bedeutendsten *E. coli*-Serovare des Pathovars EHEC in Deutschland aus den Jahre 1998-2004 (Einsendungen an das NRZ)
- Abbildung 24: Bedeutung der Serotypie in der Hierarchie der Typisierungsmethoden für *E. coli*
- Abbildung 25: Schema der Vorgehensweise bei der *E. coli*-Serotypie
- Abbildung 26: Ringversuch zur *E. coli*-Serotypie 2002
- Abbildung 27: Ringversuch zur *E. coli*-Serotypie 2003

Verzeichnis des Anhangs

- Anhang 1: Übersicht der verwendeten *E.coli*- Referenzstämmen für die O-und H-Antigen-Serotypie der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK
- Anhang 2: *E. coli*-Stämme aus Ringversuchen (EQA)
- Anhang 3: Klinische Stämme von *E. coli*- Infektionen aus der Stammsammlung des NRZ
- Anhang 4: Rezepturen der verwendeten Medien
- Anhang 5: Chemikalien und Puffer
- Anhang 6: Bunte Reihe nach FARMER
- Anhang 7: Geräteliste
- Anhang 8: LPS-Muster von *E. coli* O1-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 9: LPS-Muster von *E. coli* O2-Stämmen
- Anhang 10: LPS-Muster von *E. coli* O5-Stämmen
- Anhang 11: LPS-Muster von *E. coli* O6-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 12: LPS-Muster von *E. coli* O8-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 13: LPS-Muster von *E. coli* O26-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 14: LPS-Muster von *E. coli* O55-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 15: LPS-Muster von *E. coli* O91-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)

- Anhang 16: LPS-Muster von *E. coli* O100-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 17: LPS-Muster von *E. coli* O103:H2/ H⁻-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 18: LPS-Muster von *E. coli* O111-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 19: LPS-Muster von *E. coli* O113-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 20: LPS-Muster von *E. coli* O117-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 21: LPS-Muster von *E. coli* O145-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 22: LPS-Muster von *E. coli* O146-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 23: LPS-Muster von *E. coli* O157-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 24: LPS-Muster von *E. coli* O174-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 25: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H2-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 26: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H8-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 27: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H11-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 28: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H18-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 29: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H19-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)

- Anhang 30: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H28-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 31: LPS-Muster von *E. coli* O157-Stämmen verschiedener Pathovaren und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)
- Anhang 32: Dendrogramm der *E. coli* O-Typ Referenz-LPS-Muster

Abkürzungen

| | |
|----------------|--|
| ACL | Antigen Carrier Lipid |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| <i>astA</i> | Gen für hitzestabiles Enterotoxin |
| BfR | Bundesinstitut für Risikobewertung |
| <i>catP</i> | Gen für Katalase/Peroxidase |
| CBB | Coomassie Brilliant Blue |
| CDC | Center for Disease Control |
| D | Deutschland |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DK | Dänemark |
| <i>eaeA</i> | Intimin-Gen |
| EAggEC | Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> |
| ECA | enterobacterial common antigen |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EHEC | Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> |
| <i>ehxA</i> | Enterohämolysin-Gen |
| EIEC | Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | Enzyme linked Immunosorbent Assay |
| EPEC | Enteropathogene <i>Escherichia coli</i> |
| ETEC | Enterotoxische <i>Escherichia coli</i> |
| ExPEC | Extraintestinale Pathogene <i>Escherichia coli</i> |
| EQA | External Quality Assurance |
| EU | Europäische Union |
| F-Ag | Fimbrien-Antigen |
| <i>fliC</i> | Flagellin-Gen |
| FliC | Flagellin-Protein |
| GB | Großbritannien |
| H-Ag | H-Antigen |
| HPA | Health Protection Agency |
| IfSG | Infektionsschutzgesetz |
| i.v. | intravenös |
| JPN | Japan |

Abkürzungen

| | |
|------------|---|
| K-Ag | Kapsel-Antigen |
| KBE | Koloniebildende Einheiten |
| KDO | 2-Keto-3-desoxy-Octonsäure |
| LMW | low molecular weight |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT 2 | Salmonella Typhimurium Referenzstamm LT 2 |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| MW | molecular weight |
| N | Anzahl |
| NL | Niederlande |
| NMEC | Neonatale Meningitis <i>Escherichia coli</i> |
| np | nicht pathogen |
| NSF | nicht Sorbitol-fermentierend |
| nt | nicht typisierbar (not typeable) |
| NRZ | Nationales Referenzzentrum |
| O-Ag | O-Antigen |
| OD | optical density |
| Omp | outer membrane protein |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PFGE | Pulsfeld-Gelelektrophorese |
| rel. | relativ |
| Rf | Relative front |
| <i>rfb</i> | Genkomplex für die Synthese O-spezifischer Polysaccharide |
| RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| RT | Raumtemperatur |
| RU | Repeating unit |
| SD | Swarming Distance |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate |
| SF | Sorbitol-fermentierend |
| SOP | Standard Operation Procedure |
| spp. | Subspecies |

Abkürzungen

| | |
|-------------|---|
| SSI | Statens Serum Institut |
| STEC | Shigatoxin bildende <i>Escherichia coli</i> |
| S.Tm | Salmonella Typhimurium |
| STX | Shigatoxin |
| <i>stx1</i> | Shigatoxin 1- Gen |
| <i>stx2</i> | Shigatoxin 2- Gen |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TSA | Tryptic soy agar |
| UPEC | Uropathogene <i>Escherichia coli</i> |
| WHO | World Health Organization |

Einheiten

| | |
|-------|------------------|
| °C | Grad Celsius |
| d | Tag |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| kbp | Kilo-Basenpaare |
| kDa | Kilo-Dalton |
| kHz | Kilo-Hertz |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| mA | Milli-Ampere |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| nm | Nanometer |
| U/min | Umdrehung/Minute |
| V | Volt |
| vol% | Volumen-Prozent |
| W | Watt |

1. Einleitung

Das von Theodor Escherich 1886 beschriebene *Bacterium coli commune*, welches zu seinen Ehren 1919 *Escherichia coli* (*E. coli*) genannt wurde, zählt heute zu den am intensivsten untersuchten Mikroorganismen in der mikrobiologischen und molekularbiologischen Forschung (NEIDHARDT et al., 1996).

E. coli ist ein gram-negatives, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes stäbchenförmiges Bakterium, welches taxonomisch in die Familie der Enterobacteriaceae eingeordnet wird. Es gehört zum normalen Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier, kann aber auch in anderen Umwelthabitaten überleben und sich vermehren. Als Erstbesiedler des Darms der Neugeborenen kommt *E. coli* eine große physiologische Bedeutung zu. So dient dieser Keim, der selbst nur in geringer Zahl vorhanden ist, als Wegbereiter für die Ansiedlung obligater Anaerobier. Diese sind, ebenso wie *E. coli* für die gesunde Verdauung verantwortlich (z.B. Abbau von Gallensäuren, Bilirubin, kurzkettiger Carbonsäuren) oder als Produzent von Vitamin K, sodass man *E. coli* auch als Therapeutika gegen Darmstörungen eingesetzt hat, z.B. Mutaflor (SONNENBORN und GREINWALD, 1991).

Doch neben diesen, für die gesunde Darmflora der Säugetiere und des Menschen bedeutsamen *E. coli*, haben sich pathogene Varianten dieser *E. coli*-Bakterien entwickelt, die komplizierte und schwerwiegende Infektionen bei Menschen und Tieren verursachen und Erkrankungen, wie z.B. Colitiden, Cholera-ähnliche Durchfälle, Hämolytisch-urämisches Syndrom, blutige Ruhr-ähnliche Durchfälle, Harnwegsinfektionen, Meningitis, Septikämien und Pyelonephritiden hervorrufen.

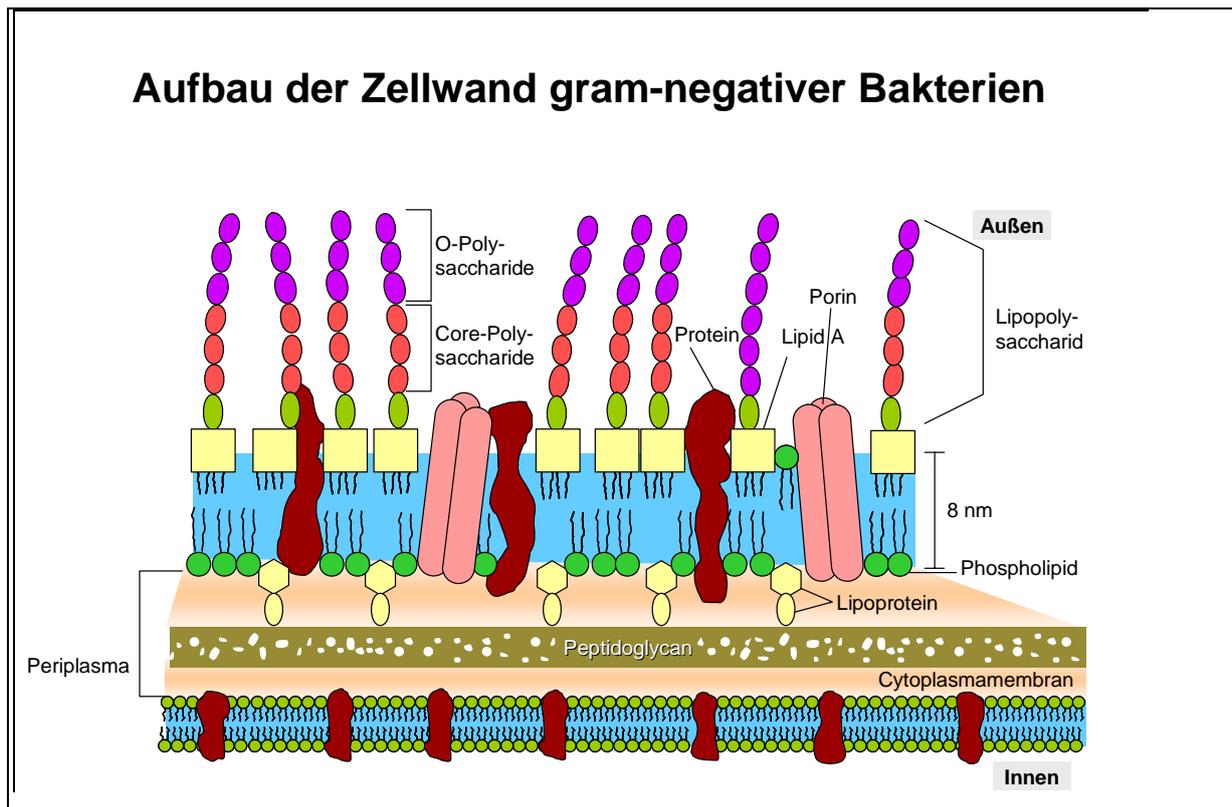
Man hat deshalb eine Einteilung dieser Erreger in sogenannte Pathovaren vorgenommen (siehe HACKER und HEESEMANN, 2000). Zu den wichtigsten intestinalen Erregern zählen die EHEC/STEC (enterohämorrhagische *E. coli*/ Shigatoxin bildende *E. coli*), EPEC (enteropathogene *E. coli*), ETEC (enterotoxische *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*) und EAaggEC (enteroaggregative *E. coli*). UPEC (uropathogene *E. coli*) und NMEC (Neonatale Meningitis *E. coli*) sind Pathovaren der extraintestinalen *E. coli*.

Die Pathogenität der verschiedenen Pathovaren liegt darin begründet, dass bestimmte genetische und biochemisch zu definierende Faktoren, wie Adhäsine (Fimbrien, Curli), Invasine, Toxine, Moduline, Effektorproteine, Siderophore und andere Überlebensfaktoren von diesen gebildet werden, die für die Pathovaren charakteristische Virulenzmuster ausbilden und mit Hilfe dieser Determinanten auch diagnostisch erkannt werden können (LEVINE, 1987, TSCHÄPE und FRUTH, 2001).

E. coli ist nicht nur hinsichtlich seiner Pathovaren außerordentlich divers, sondern auch in seinen Spezies spezifischen Eigenschaften, wie z.B. die Fermentation von Kohlenhydraten, Bildung von Sekundärprodukten oder Oberflächenstrukturen.

Eine besondere Rolle nimmt hierbei die Zellwand des Bakteriums ein. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, ist sie durch einen komplizierten Aufbau gekennzeichnet.

Abbildung 1: Aufbau der Zellwand gram-negativer Bakterien



Die Zellwand besteht aus zwei Phospholipiddoppelschichten, einer Cytoplasmamembran, welche das Cytosol umgibt, und einer äußeren Membran, die durch einen asymmetrischen Aufbau gekennzeichnet ist.

Zwischen beiden Membranen befindet sich der periplasmatische Raum, in dem ein Zellgerüst aus Peptidoglycan (acetylierte Polysaccharide) und Lipoproteinen angeordnet ist. Jede Membran ist etwa 8 nm dick, die Peptidoglycanschicht ist ca. 2 nm stark, so dass sich für die gesamte Zellwand eine Stärke von 18 nm ergibt (SELTMANN und HOLST 2002).

Eine wichtige Komponente der Zellwand ist die Gruppe der äußeren Membranproteine (outer membrane proteins = Omp) (siehe Abbildung 1). Hierzu zählt das „outer membrane protein A“ (OmpA), welches die Phospholipiddoppelschicht durchdringt und kovalent mit dem Peptidoglycan verbunden ist. Neben der Funktion der Porenbildung für den Transport hydrophiler Substanzen, sorgt es zusammen mit dem Braun'schen Lipoprotein (ebenso mit

dem Peptidoglycan vernetzt) und weiteren Mureinlipoproteinen für die Stabilität der Zellwand (MAMAT et al., 1999).

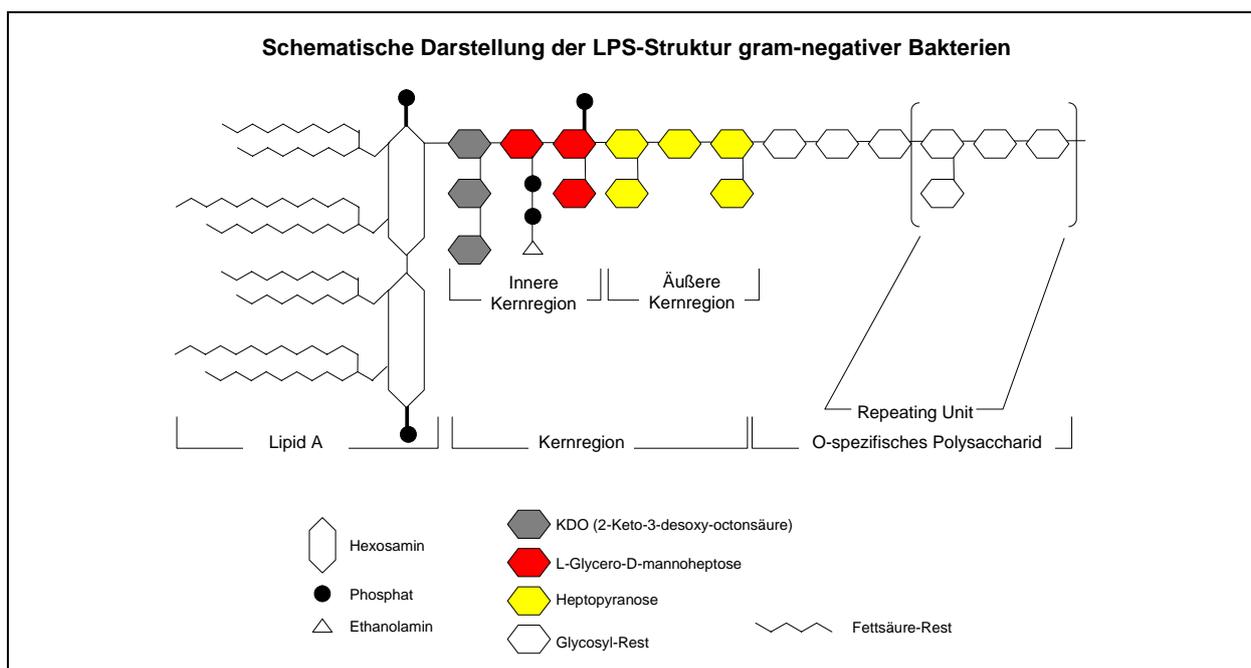
Weitere Porine, wie das „outer membrane protein F“ (OmpF), das „outer membrane protein C“ (OmpC), das „outer membrane protein D“ (OmpD) bei *S. Typhimurium* und das PhoE bei *E. coli* (unter Phosphatmangel gebildet) gewährleisten eine Aufnahme ionogener, niedermolekularer Nährstoffe. Sie bilden hydrophile Diffusionskanäle in der hydrophoben Matrix. Die aufgelagerten amphiphilen Makromoleküle, Lipopolysaccharid (LPS), Kapsel-Polysaccharid (K-Antigen) und „enterobacterial common antigen“ (ECA) bei Enterobakterien, sind durch bivalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) verknüpft (SELTMANN und HOLST, 2002).

Im Zusammenspiel aller Strukturbestandteile der bakteriellen Zellwand ist das LPS-Molekül von besonderer Bedeutung. Es ist der Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran. Bei *E. coli* werden drei Viertel der gesamten Oberfläche von LPS-Molekülen besetzt. In der Gesamtbilanz der metabolischen Stoffwechselleistung kommt der Synthese von LPS deshalb eine zentrale Bedeutung zu, denn sie nehmen etwa 22% der metabolischen Leistungen der Zelle in Anspruch (WESTPHAL und JANN 1991).

Das LPS-Molekül besteht aus 3 Teilen: dem lipophilen Lipid A, der Kernregion (Oligosaccharid) und der O-spezifischen Seitenkette (Polysaccharid) (siehe Abbildung 2).

Das Lipid A besteht aus zwei phosphorylierten Glucosaminen, von denen jedes mit mehreren Fettsäuren verestert ist (ZÄHRINGER et al., 1999, RAETZ und WHITFIELD, 2002).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der LPS-Struktur gram-negativer Bakterien



Es verankert das LPS-Molekül durch hydrophobe und elektrostatisch-ionogene Wechselwirkungen in der Phospholipiddoppelschicht der äußeren Membran. Hierdurch entstehen chemische Barrieren, die einen gewissen Schutz von äußeren Einflüssen bieten. So können z.B. einige Detergentien, Antibiotika, Gallensalze oder Lysozym nicht eindringen. Das Lipid A erweist sich darüber hinaus in isolierter Form als äußerst toxisch. Es wird deshalb auch als Endotoxin von *E. coli* bezeichnet. (MAMAT et al., 1999, RIETSCHEL und WESTPHAL, 1999). Das Lipid A von *E. coli* ist dem der meisten gram-negativen Bakterien sehr ähnlich.

Mit dem Lipid A ist die Kernregion (Core) verbunden, die in innere und äußere Region unterteilt ist. Die innere Kernregion ist konserviert und bei allen Enterobacteriaceae, wie Salmonellen und *E. coli* nahezu identisch. Sie besteht aus 2-Keto-3-desoxy-Octonsäure (KDO), Heptosen und Ethanolamin (VAARA, 1999). Die äußere Kernregion hingegen ist variabel und liegt in den Formen R1, R2, R3, R4 und K12 vor. Sie wird charakterisiert durch die Komponenten Glucose, Galactose und N-Acetylderivaten dieser Verbindungen. Die Variabilität ergibt sich aus der Anzahl Komponenten und der Art ihrer Verknüpfung. Die R1-Form wird hauptsächlich bei extraintestinalen *E. coli*-Isolaten gefunden, die R3-Form vorrangig bei intestinalen *E. coli*-Stämmen (CURRIE und POXTON, 1999).

Die R1-Form kommt in der äußeren Kernregion bei *E. coli* am häufigsten vor, gefolgt von den Formen R2, R3, R4 und K12 (AMOR et al., 2000).

In der äußeren Kernregion wird das O-spezifische Polysaccharid verankert, welches in struktureller Vielfalt vorliegt und letztlich die große Biodiversität des LPS-Moleküls begründet. Es besteht bei *E. coli* aus 10 bis 18 sich wiederholenden Einheiten (engl.: repeating unit), die aus Polysacchariden, mit möglichen Modifikationen, z.B. O-Acetylierung und Einbau von Sialinsäure oder Aminosäuren aufgebaut sind. Inzwischen sind für *E. coli* 181 verschiedene O-Antigene bekannt (*E. coli*-Serotypen), die auch bei Bakterien verschiedener Spezies identisch sein können, z.B. Salmonella O34 und *E. coli* O157 (ØRSKOV et al., 1984, RICE et al., 1992, SHIMADA et al., 1992, SCHEUTZ et al., 2004, KHAN et al., 2003).

Die Biosynthese von LPS erfolgt hauptsächlich in der Cytoplasmamembran in einem komplexen Prozeß, wobei Lipid A und Kernregion, sowie O-spezifische Polysaccharide in mehreren differenten Metabolismen synthetisiert und anschließend miteinander verknüpft werden. Mehrere verschiedene Gene kodieren für die Enzyme, welche die einzelnen Stadien der Synthesen katalysieren (z.B. *rfb*-Gene für die Synthese O-spezifischer Polysaccharide)

(KEENLEYSIDE and WHITFIELD, 1999).

Für die Bildung der O-spezifischen Polysaccharide wurden zwei Wege beschrieben:

Der vom Gen *wzy* (Polymeraseaktivität) abhängige Syntheseweg und der ABC-Transporter-abhängige Weg (KEENLEYSIDE and WHITFIELD, 1999).

Im ersten Fall werden die Monosaccharideinheiten nicht schrittweise in die Kette eingebaut, sondern es werden Bausteine gebildet, welche an der äußeren Seite der Membran zur kompletten Kette verbunden werden. Dieser Prozeß ist abhängig vom Gehalt an Antigen Carrier Lipid (ACL) und Wzx, dem Transporter dieser Einheiten (Flippase).

Im Fall des ABC-Transporters wird die komplette Kette im Inneren synthetisiert, durch die Cytoplasmamembran transportiert und verankert. Dieser Weg scheint vorrangig für Polysaccharide zu erfolgen, welche aus Homopolymeren aufgebaut sind (z.B. *E. coli* O9 aus 5 Mannose-Untereinheiten) (SELTMANN und HOLST, 2002).

Eine Substitution mit Glucose (unter Kontrolle der Gene *oafR-oafE*), oder der Einbau von O-Acetylgruppen (Gen *oafA*) erfolgt nach der Polymerisation der Kette, während der Einbau von Galactose, Mannose, Rhamnose und Abequose während der Startphase der Synthese stattfindet, abhängig von der Substratspezifität der einzelnen Enzyme (SELTMANN und HOLST, 2002).

Die Länge der Kette wird durch das Gen *wzz* reguliert, indem ein Protein Wzz (36,5 kDa) in den periplasmatischen Raum sezerniert wird, welches ein Stopp-Signal auslöst.

Auf dem letzten Stadium der LPS-Biosynthese wird die O-spezifische Polysaccharidkette mit der äußeren Kernregion durch eine Ligase (WaaL) verbunden (KEENLEYSIDE und WHITFIELD, 1999; GROZDANOV et al., 2002).

Durch die molekulare Diversität der Biosynthese-Cluster wird eine große Vielfalt an O-Antigenen gewährleistet, die sich in einer serologisch identifizierbaren Diversität dokumentiert. REEVES et al. beschrieben 1993 diese Vielfalt als Antwort auf den Selektionsdruck durch die Immunreaktion des jeweiligen Wirts, und als deren Quelle hierfür Rekombinationen und lateraler Gentransfer in den Regionen der O-Polysaccharid-Biosynthese.

Eine weitere wichtige Komponente der Zellwand von *E. coli* sind die Flagellen (H-Antigene), die das Erreichen verschiedenen ökologischer Habitate und damit auch der Nährstoffe gewährleisten, aber auch als Fluchtmöglichkeit dienen, sowie dem passiven Schutz vor Ingestion durch Makrophagen. Flagellen sind wie die O-Antigene einem starken Selektionsdruck ausgesetzt.

Der Flagellenapparat (siehe Abbildung 3) ist in Gegensatz zum Strukturelement LPS zwar nicht für das Überleben des Bakteriums notwendig, aber die durch ihn ermöglichte Beweglichkeit ist entscheidend für die Besiedlung mikroökologischer Nischen.

Bakterielle Flagellen sind dünn (ca. 20nm) und helikal gewunden. *E. coli* sind peritrich begeißelt, d.h. Flagellen können an mehreren Stellen auf der Oberfläche verankert sein. Diese Form verleiht ihnen die Möglichkeit sich langsam und stetig geradeaus zu bewegen, indem alle Flagellen gebündelt diese Bewegung ausführen. Kommt es zur Auflösung des „Bündels“ drehen sich diese Bakterien auf der Stelle, bis zur neuen Formierung und Bewegung in einer anderen Richtung (MacNAB, 1996).

In der Abbildung 3 ist der Aufbau dieses Flagellenapparates dargestellt.

Das Filament der Flagelle polymerisiert aus rund 20.000 Untereinheiten des Proteins Flagellin (FliC, ca. 50 kDa) mit einer Vielzahl non-polarer, hydrophober Aminosäuren, wobei Cystein und Tryptophan bisher nicht nachgewiesen wurden, Prolin und Histidin selten und Methionin, Tyrosin, und Phenylalanin in geringer Menge vorkommt (MacNAB, 1996, SELTMANN und HOLST, 2002). Die Flagellin-Einheiten sind zylindrisch oder tubulär in einer Helix angeordnet. Dadurch wird der Flagelle die nötige Stabilität verliehen, um als Propeller wirken zu können. Die Länge des Filaments hängt von äußeren physikalischen Bedingungen, wie pH und Ionenstärke, ab. Die Verlängerung der Kette erfolgt an ihrem Ende, so daß durch mechanische Einwirkung beschädigte Flagellen auf diese Weise regenerierbar sind.

Das Filament ist durch einen Haken, engl.: Hook, mit der Bakterienzelle verbunden. Der Haken ist strukturell dem Filament ähnlich, wird aber von einem eigenständigen Protein (FlgE) gebildet. Er ist ca. 55nm lang und besteht aus 130 Untereinheiten. Zwischen Haken und Filament sind zwei Verbindungsproteine (engl.: hook-filament-junction) angeordnet (FlgK, FlgL) die als Adaptoren wirken sollen (MacNAB, 1996). Die Strukturen dieser 3 Proteine sind hoch konserviert und für *E. coli* und *Salmonella* nahezu identisch.

Der Haken ist mit dem Basalkörper verbunden, welcher fest in der bakteriellen Zellwand verankert ist. Dieser wird durch einen Zylinder charakterisiert, der von 4 Ringen umgeben wird. An der Außenseite befinden sich Ring L und P (gebildet aus den Proteinen FlgH und FlgI), innen Ring MS (FliF) und C (FliG). Der Zylinder (engl.: rod) wird von den Proteinen FlgG, FlgB, FlgC, FlgF und FliE gebildet. Der gesamte Basalkörper dient neben der Verankerung auch als Grundlage für den Antrieb (Motor) und das Ausgleichsgewicht (Stator) (siehe Abbildung 3). In der Zellmembran sind zwei weitere Proteine intergriert, die für die

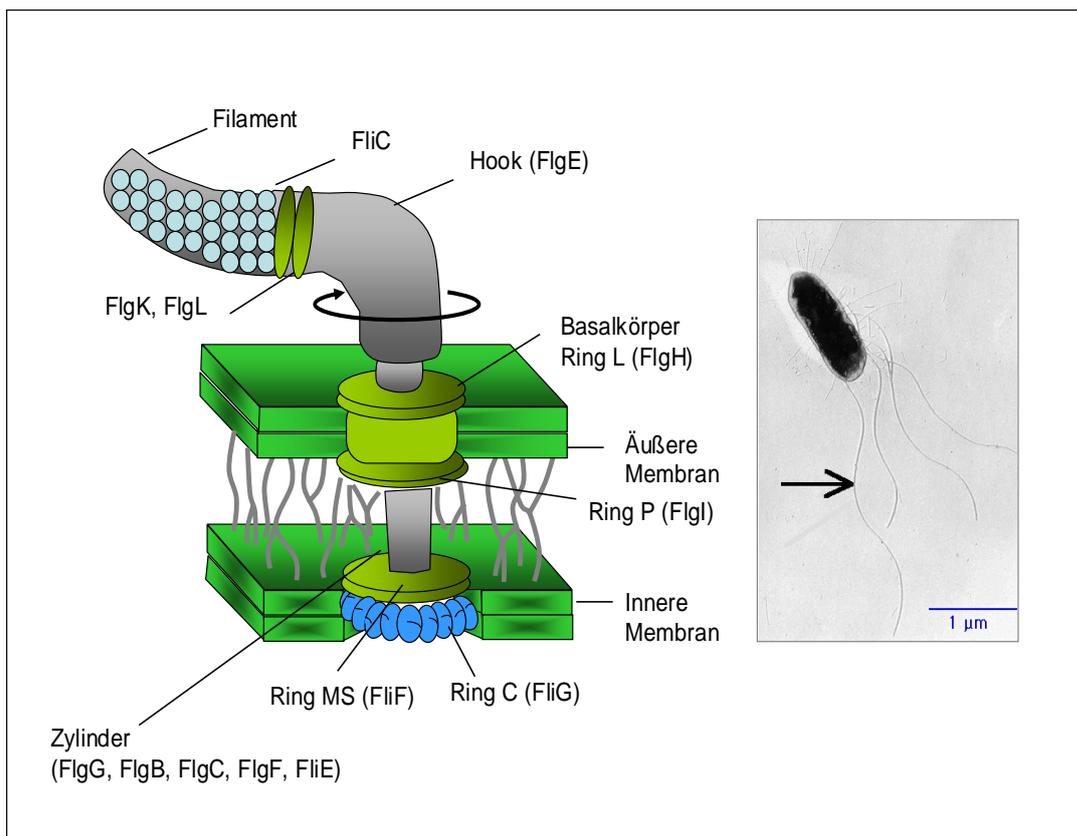
Rotation des Motors verantwortlich sind (MotA, MotB), die aber nicht am Aufbau des Flagellenapparates beteiligt sind.

Für die Bildung des Apparates sind mehr als 40 Gene notwendig. Die Variabilität in der Antigenität wird durch die Flagellin-Einheiten (FliC) vermittelt, welche vom Gen *fliC* kodiert werden. Der große Polymorphismus des FliC-Proteins zeigt sich auch im Polymorphismus des *fliC*-Gens.

Dieses ermöglicht eine molekulare Typisierung der H-Antigene von *E. coli* (FIELDS et al., 1997; MACHADO et al., 2000; REID et al., 1999).

Mutationen in den Flagellen-Genen führen nicht nur zum Polymorphismus und der hohen Antigenvariabilität, sondern auch zu unbeweglichen Bakterien. In der Regel wachsen diese Mutanten langsamer als Wild-Typ-Isolate (MacNAB, 1996).

Abbildung 3: Flagellenapparat von *E. coli*



Die beschriebenen Strukturen der bakteriellen Zellwand (LPS, Flagellen) wurden, neben den biochemischen Identifizierungsmethoden (EWING, 1986) zur taxonomischen Charakterisierung von Bakterien, schon frühzeitig wegen ihrer Vielfältigkeit in ihrer

Bedeutung für eine Subdifferenzierung der Spezies erkannt, und die Etablierung von Testmethoden zur Typisierung versucht.

Bereits 1925 hatten SMITH et al. auf serologische Besonderheiten von „Coli-Bakterien“ hingewiesen, wie z.B. ihre antigenen Eigenschaften von Kapseln im Gegensatz zu kapsellosen Varianten.

Durch die Einführung des Typisierschemas für Salmonellen durch KAUFFMANN und WHITE („Kauffmann-White-Schema“) auf der Basis von serologischem Nachweis der O- und H-Antigene war eine Grundlage geschaffen worden, die auch für die Subtypisierung weiterer Spezies von Interesse war.

Für die Charakterisierung von *E. coli*-Isolaten auf der Basis dieser Oberflächenstrukturen schufen Anfang der 40er Jahre des 20. Jh. KAUFFMANN und VAHLNE (1945) eine „*E. coli*-Serologie“, die für die Differentialdiagnostik Verwendung fand. Durch KNIPSCHILDT erfolgte 1945 eine Weiterentwicklung und Systematisierung durch Einteilung in vier Gruppen von Antigenen:

1. somatische thermostabile O-Antigene
2. thermolabile oder thermostabile Hüllen- oder Kapselantigene (K-Antigene)
3. thermolabile Geißelantigene (H-Antigene)
4. Fimbrienantigene (F-Antigene).

Mit Hilfe dieser Gruppen von Antigenen, aber besonders den O- und H-Antigenen, wurde ein System der Subdifferenzierung entwickelt, welches als Serotypie bezeichnet wird. Es wurden die Begriffe der „Serotyp“ und „Serovar“ geprägt. Als Serotyp wird der durch die Identifizierung des O-Antigens bzw. des H-Antigens mittels Antiseren gekennzeichnete Stamm bezeichnet. Unter Serovar wird der mit kompletter Antigenformel bestimmte Stamm (mindestens O- und H-Antigene) verstanden (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984). Dabei steht heute aber die Fimbrien- und Kapseltypisierung nicht mehr im Vordergrund einer Subdifferenzierung, weil nur die Biodiversität der O- und H-Antigene eine klassifikatorische Qualität besitzen. *E. coli*-Stämme können gleichzeitig mehrere Fimbrienantigene ausbilden (3 bis 7 Typen), aber dabei nie eine Stamm-spezifische, sondern nur eine Pathovar spezifische Gruppierung aufweisen (DODSON et al., 1997). Innerhalb eines Fimbrientyps (z.B. F4 (K88)) gibt es wenige Subtypen oder Allele.

Bezüglich der K-Antigene trifft ihre klassifikatorische Qualität nur bei einigen *E. coli*-Stämmen zu, z.B. *E. coli* O18:K1:H7.

Die Serotypie stellt aufgrund des umfangreichen Polymorphismus der O- und H-Antigene für die Untersuchung von *E. coli*-Bakterien, im Gegensatz zu der ebenfalls in dieser Zeit

entwickelten Chemo- oder Biotypie, auch heute noch eine grundlegende Methode dar, und ist als „Gold-Standard“ der Subdifferenzierung anzusehen.

Die antigene Vielfalt der O- und H-Antigene liefert eine hinreichend variable Differenzierungsmöglichkeit von *E. coli*-Stämmen und ermöglicht damit eine Klassifikation von *E. coli* in charakteristischen Gruppen (Serotypen, Serovare) für weitere analytische (z.B. Erfassung von Virulenzeigenschaften) oder epidemiologische Untersuchungen.

Zur Weiterentwicklung der Serotypie hat in den letzten Jahren die Anwendung molekularer Methoden für die Analyse der LPS und Flagellen, sowie die molekulargenetischen Informationen zu deren Biosynthese beigetragen.

Arbeitsgruppen um WESTPHAL (1965), JANN (1970), und später KNIREL und KOCHETKOV (1994), WEINTRAUB (1993), MEDINA (1994) und STAAF et al. (1995, 1999) beschäftigten sich intensiv mit der Aufklärung der Zusammensetzung der Zellwand gram-negativer Bakterien und konnten eine Vielzahl von O-Antigenen strukturell beschreiben. Heute sind die Strukturen von rund zwei Drittel aller *E. coli* O-Serotypen bekannt.

Zur molekularen Analyse des H-Antigen-Polymorphismus sind Proteinmethoden ungeeignet (z.B. elektrophoretisch durch SDS-PAGE), aber durch DNA-Sequenzierung bzw. der Bestimmung des RFLP des *fliC*-Gens konnten wertvolle molekulare Daten zum Zusammenhang von antigenem Polymorphismus und DNA-Sequenz –Unterschieden des *fliC*-Gens gewonnen werden (MACHADO et al., 2000; FIELDS et al. 1997; PRAGER et al., 2003).

Obwohl zahlreiche molekulare Analysen zur Natur der O- und H-Antigene vorliegen und damit ein besseres Verständnis ihrer Rolle in der Evolution, Epidemiologie und Systematik vorliegen, fehlen doch systematisch zusammenfassende Bearbeitungen der breiten Palette von Typen und der Beleg inwieweit deren serologische Unterschiede auch auf eine molekulare Basis gestellt werden können. Es wäre zu klären, ob diese Methoden zur Absicherung der Serotypie Verwendung finden können unter Beibehaltung dieser Methode als „Gold-Standard“, oder ob sie die Serotypie abgelösen in der Lage sind.

2. Problemstellung

Das von KAUFFMANN begründete und von ØRSKOV et al. 1984 fortgeführte Schema zur Typisierung der O- und H-Antigene von *Escherichia coli* stellt bis heute die Grundlage für die Einteilung dieser Spezies in Serovare dar. Die Serotypie-Methode selbst wird in einer Vielfalt von Verfahren, in der Regel als Objektträgeragglutination durchgeführt. Weltweit wurden deshalb inzwischen Widersprüche beobachtet, die sich aus der Serotypisierung ursprünglich identischer Isolate in verschiedenen Laboratorien ergaben (siehe ZHANG et al., 2000).

Deshalb sollte in dieser Arbeit die Standardisierung der Methode zur serotypischen Bestimmung der O- und H-Antigene von *E. coli*, sowie die Formulierung einer „Standard Operation Procedure“ (SOP) erfolgen.

Desweiteren sollte untersucht werden, inwieweit diese phänotypische Methode, durch eine molekulare Charakterisierung von LPS und *fliC* zur Analyse des O- und H-Antigen-Polymorphismus bestätigt werden kann, oder ob die Serotypie als „Gold-Standard“ durch molekulare Methoden abgelöst wäre.

Ein weiteres Problem stellt die Erfassung und Charakterisierung neuer Serotypen dar.

Anhand von bisher serotypisch nicht definierbaren Isolaten aus der Stammsammlung des NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger am Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, sollte durch Kombination der Serotypie mit molekularen Methoden eine solche Neubeschreibung der O- und H-Antigene möglich sein.

Zur Analyse der Bedeutung der O- und H-Antigene für die epidemiologische Erfassung von *E. coli*-Infektionen sollten Daten des Nationalen Referenzzentrums aus den Jahren 1998-2004 unter besonderer Berücksichtigung des *E. coli*-Pathovars EHEC bearbeitet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Bakterienstämme

Die Untersuchungen zur Serotypie von *E. coli*-Stämmen und die Anwendung alternativer Typisierungsmethoden wurden von 1998-2004 an 4431 Isolaten verschiedenen Ursprungs aus der Sammlung des NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, sowie 235 Referenzstämmen für *E. coli* O- und H-Antigene der Sammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, durchgeführt.

3.1.1. Referenzstämmen für *E. coli*-O-Antigene

Zur Herstellung der Testseren für die O-Antigenbestimmung und die Vergleichsuntersuchungen mit der Methode der LPS-Musteranalyse wurden als Referenzstämmen für O-Antigene definierte 181 *E. coli*-Stämme aus der Sammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, genutzt. Detaillierte Auflistung siehe Anhang 1.

3.1.2. Referenzstämmen für *E. coli*-H-Antigene

Zur Herstellung der Testseren für die H-Antigenbestimmung, sowie für die Analyse des *fliC*-Gens, wurden die 54 H-Antigen-Referenzstämmen der Sammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, verwendet, welche ebenfalls in Anhang 1 aufgelistet sind.

3.1.3. Klinische Stämme von *E. coli*-Infektionen

Aus den laufenden Einsendungen an das NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger wurden für die Untersuchungen *E. coli*-Isolate ausgewählt, welche unterschiedlichen Pathovaren zugeordnet werden konnten.

Dabei kamen von 1998-2004 insgesamt 4431 Isolate der Pathovaren EHEC/STEC, EAaggEC, EPEC, ETEC und ExPEC zur Anwendung. Von diesen wurden 222 Stämme einer LPS-Analyse unterworfen und 39 Stämme für die *fliC*-PCR, sowie die 120 Stämme für die Optimierung der Serotypiemethode eingesetzt. Diese Stämme sind in Anhang 3 aufgeführt.

3.1.4. *E. coli*-Stämme aus Ringversuchen (EQA)

Für die Prüfung der internationalen Vergleichbarkeit der erarbeiteten *E. coli*-Serotypie-Protokolle (SOP) wurden 23 *E. coli*-Stämme eingesetzt, welche zu Ringversuchszwecken von der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, an das NRZ versandt worden waren.

Die Stämme sind in Anhang 2 enthalten.

3.2. Medien

Zur Untersuchung von Einflüssen der Kulturbedingungen auf die Ausbildung der O- und H-Antigene kamen verschiedene Nährmedien zur Anwendung.

3.2.1. Nährmedien für die Anzucht und biochemische Charakterisierung

Zur Anzucht der Bakterienstämme kamen folgende Nährmedien zum Einsatz:

Enterohämolysinagar mit und ohne Antibiotika (Novobiocin, Cefsoludin),
Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar,
Nähragar.

Ihre Zusammensetzung ist in Anhang 4 aufgeführt.

3.2.2. Nährmedien für die Bildung der *E. coli*-O-Antigene

Die Bildung der O-Antigene der *E. coli*-Stämme erfolgte mit Hilfe von:

Enterohämolysinagar ohne Antibiotika,
Nähragar,
Antigen-Bouillon.

Die Zusammensetzung ist in Anhang 4 enthalten.

3.2.3. Nährmedien und Chemikalien für die Bildung der E. coli-H-Antigene

Für die Isolierung der H-Antigene wurden zuzüglich zu den unter 3.2.2. aufgeführten Medien eingesetzt:

Beweglichkeitsagar,

PBS-Formalin-Lösung.

Die Zusammensetzung ist in Anhang 4 aufgeführt.

3.2.4. Nährmedien und Chemikalien für die LPS-Präparation

Die Anzucht der Bakterien für die LPS-Präparation erfolgte in Nährbouillon und auf Tryptic-Soy-Agar.

Für die Präparation wurde Tris-Puffer verwendet.

Die Zusammensetzungen sind in Anhang 4 und 5 aufgeführt.

3.3. Anzucht der Stämme

Die Anzucht der Stämme erfolgte in der Regel durch fraktionierten Ausstrich auf Enterohämolysinagar-Platten (siehe Anhang 4) über Nacht bei 37°C im Inkubator. Abweichende Anzuchtverfahren sind in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt.

3.3.1. Beweglichkeit

Die Prüfung der Beweglichkeit erfolgte in U-Röhrchen (mundgeblasenes Glasrohr, Durchmesser 8 mm; Rettberg GmbH), die zu $\frac{3}{4}$ mit Beweglichkeitsagar gefüllt waren (siehe Anhang 5).

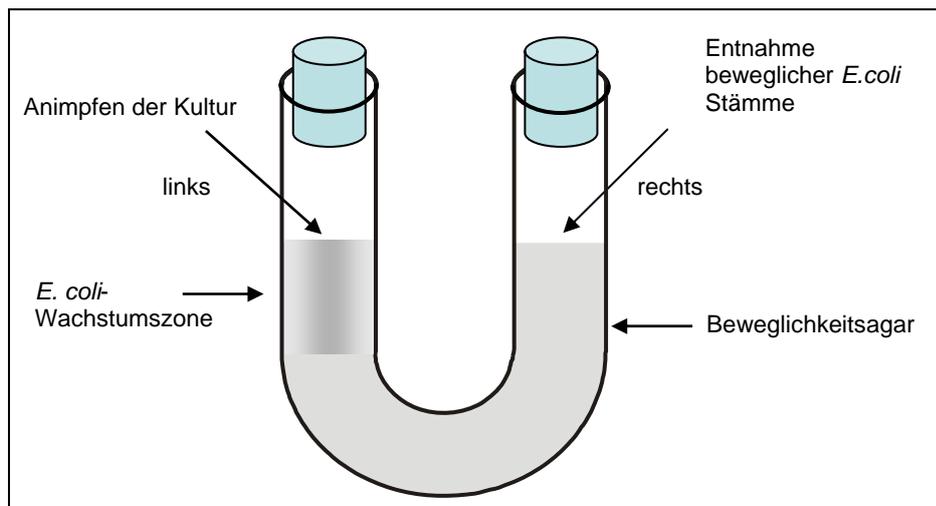
Nach dem Beimpfen mit einer Kolonie einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* auf Enterohämolysinagar-Platten mittels Impföse oder Glasstab auf der jeweils linken Seite des U-Röhrchens, wurden die Stämme im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Das Wachstum wurde täglich beobachtet und protokolliert. Eine schematische Darstellung dieses Vorgehens ist in Abbildung 4 zu sehen.

Als „beweglich“ wurden solche Stämme bewertet, die auch die rechte Seite, also das komplette U-Röhrchen durchwachsen. Als „unbeweglich“ wurden solche Stämme bewertet, die nach 14 Tagen nicht die rechte Seite, d.h. weniger als $\frac{2}{3}$ des U-Röhrchens durchwachsen.

Für die Präparation zur H-Antigen-Bestimmung erfolgte eine zweite Passage im U-Röhrchen mit Material (ca. 10µl) von der durchwachsenen rechten Seite des 1.U-Röhrchens. Nach erneuter Inkubation bei 37°C konnten nach 24- 48 Stunden, wiederum aus der durchwachsenen rechten Seite des U-Röhrchens, Proben für die weitere Bearbeitung entnommen werden (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Beweglichkeitsprüfung mittels U-Röhrchen



3.3.2. Sauerstoffmangel

Zur Prüfung der Produktion von (LPS) und Flagellin unter Sauerstoffmangelbedingungen erfolgte die Anzucht der *E. coli*-Stämme in unterschiedlichen Medien (Tryptic-Soy-Agar, Nähragar, Beweglichkeitsagar) auf Petrischalen und in U-Röhrchen im Anaerobiertopf (Oxoid Ltd.) unter Zusatz von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel (AnaeroGen™, OXOID, GB).

Die Inkubationszeit betrug für LPS 24 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 30 und 37°C.

Die Bildung von Flagellen wurde bei 30 und 37°C über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht.

3.3.3. Temperatur

Analog zu der unter 3.1. beschriebenen Prüfung der Beweglichkeit wurden Stämme bei 30°C und bei Raumtemperatur (Klimatisierung der Laborräume: 21°C + 3°C) kultiviert, zur Untersuchung der Variabilität der *E. coli*-Flagellen-Expression.

3.4. Biochemische Charakterisierung der Isolate

Die Typisierung der *E. coli*-Stämme durch Klassifizierung der O-Antigene und H-Antigene erfolgt unter der Voraussetzung der eindeutigen Identifizierung der Spezies.

Insbesondere für die klinischen Stämme aus *E. coli*-Infektionen (siehe Abschnitt 3.1.3.) wurde die Testung biochemischer Stoffwechselreaktionen mit der „Bunten Reihe nach FARMER“ angewandt (siehe Anhang 6) (FARMER, 1996; EWING, 1986).

Nicht eindeutig identifizierbare Isolate wurden mittels BIOLOG MicroLog TMSsystem, Release 4.0, nach Herstellervorschrift untersucht.

3.5. Herstellung und Prüfung der Testseren zur Erfassung von *E. coli*-O- und H-Antigenen

Die Grundlage der Serotypie von *E. coli*-Stämmen bilden Testseren, die auf der Basis von Antigen-Präparationen aus Referenzstämmen mit charakteristischen Antigenstrukturen hergestellt wurden. Es werden hierzu die definierten 235 *E. coli*-Referenzstämmen der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, für O- und H-Antigene verwandt.

3.5.1. Antigen-Präparation

Die Präparation der Antigene erfolgte nach biochemischer und serotypischer Überprüfung der entsprechenden *E. coli*-Referenzstämmen. Die Anzucht wurde durchgeführt wie unter 3.2.2., 3.3. und 3.3.1. beschrieben.

3.5.1.1. O-Antigene

Jeweils eine Kolonie einer bestätigten Kultur wurde mittels Impföse von einer Enterohämolysinagar-Platte ohne Antibiotika nach Standard-Anzucht (18 Stunden, 37°C) in 6 Röhren mit je 8 ml Antigen-Bouillon abgeimpft.

Dieser Bouillon wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Abtötung der Bakterien und Zerstörung der hitzelablen Kapsel- und H-Antigene wurden die Kulturen für 1 Stunde bei 90°C im Wasserbad erhitzt.

Nach Abkühlung wurde 1ml dieser Bouillon in ein separates Gefäß zur O-Antigen-Kontrolle entnommen. Die Kulturröhren wurden 10 min. bei 5.000 x g zentrifugiert.

Nach Resuspendierung der Pellets in sterile PBS und Herstellung einer Stammlösung durch Einstellung einer optischen Dichte (OD) nach McFarland (gegen einen Bariumsulfat-Standard) von 0,75 war die O-Antigen-Präparation für die Immunisierung einsetzbar.

3.5.1.2. H-Antigene

Zur Präparation von H-Antigenen für die Immunisierung wurde jeweils eine Kolonie, einer im U-Röhren geprüften beweglichen *E. coli*- Referenzkultur, mittels Impföse von einer Enterohämolysinagar-Platte ohne Antibiotika nach Standard Anzucht (18 Stunden, 37°C) in 6 Röhren mit je 8 ml Antigen-Bouillon angeimpft.

Wie unter 3.5.1.1. beschrieben wurden diese Bouillon-Röhren inkubiert.

Anschließend wurden zur Abtötung der Bakterien und Stabilisierung der H-Antigene je Röhren 800µl 10% PBS-Formalin-Lösung hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur war die H-Antigen-Präparation für die Immunisierung einsetzbar.

Zur serologischen H-Antigen-Kontrolle wurde 1ml fertige Bouillon in ein separates Gefäß überführt und hinsichtlich H- (und O-)Antigen des jeweiligen Referenzstammes geprüft.

3.5.2. Immunisierung

Zur Immunisierung wurden Kaninchen der Rasse New Zealand mit einem Gewicht von 3-5kg (Lieferant: BfR Berlin-Marienfelde; Tierversuchsanzeige: Az.: 42502-3-356, Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Halle) verwendet.

Die Räume der Tierhaltung waren klimatisiert auf 18-21°C, hatten 75% rel. Luftfeuchte und einen Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden.

Gefüttert wurde mit Alleinfutter für Kaninchen (ssniff® K-H, SSNIFF Spezialdiäten GmbH), Heubriketts (Pressling, SSNIFF Spezialdiäten GmbH) und Wasser ad libitum.

Nach einer Quarantänezeit von einer Woche ab Lieferung wurden den Tieren gemäß Immunisierungsschema (siehe Tabellen 1, 2) die Antigen-Präparationen i.v. in die Ohrtrandvene appliziert.

Mit Beendigung des Versuches wurden die Tiere nach Inhalationsnarkose entblutet.

Tabelle 1: Immunisierungsschema für O-Antigene

| Tag | Immunisierungsmenge | Zellzahl (ca. KBE) |
|----------------|----------------------------|---------------------------|
| 0/ Probekblut | - | - |
| 1 | 0,5 ml | 5×10^8 |
| 3 | 1,0 ml | 1×10^9 |
| 7 | 1,5 ml | $1,5 \times 10^9$ |
| 10 | 2,0 ml | 2×10^9 |
| 14/ Probekblut | 2,0 ml | 2×10^9 |
| 17 | 2,0 ml | 2×10^9 |
| 21/ Entbluten | | |

Tabelle 2: Immunisierungsschema für H-Antigene

| Tag | Immunisierungsmenge | Zellzahl (ca. KBE) |
|----------------|----------------------------|---------------------------|
| 0/ Probekblut | - | - |
| 1 | 0,5 ml | 5×10^8 |
| 5 | 1,0 ml | 1×10^9 |
| 10 | 1,0 ml | 1×10^9 |
| 15 | 2,0 ml | 2×10^9 |
| 20 | 2,0 ml | 2×10^9 |
| 25/ Probekblut | | |
| 30/ Entbluten | | |

3.5.3. Serumgewinnung

Das Serum aus dem in sterilen Glasgefäßen (z.B. Erlenmeyerkolben) aufgenommenen Blut wurde nach Inkubation bei 37°C für 1 Stunde und anschließender Kühlung bei 4°C über Nacht gewonnen. Die Reste des Blutkuchens wurden durch Zentrifugation bei 5.000 x g abgetrennt.

Die Aufbewahrung der Antiseren erfolgte bei 4°C nach Zusatz von 1ml 10%iger NaN₃-Lösung pro 100 ml Serum.

Zur Testung der Titer und zur Prüfung mit dem Referenzset wurde eine Gebrauchsverdünnung von 1:10 in PBS hergestellt.

3.5.4. Testung der Seren mit den homologen Stämmen und dem Referenzset

Zur Testung der Antiseren wurden die zur Immunisierung eingesetzten Antigen-Präparationen (Abschnitte 5.1.1. und 5.1.2.), sowie Antigen-Präparationen von klinischen Stämmen aus der Stammsammlung des NRZ und Antigen-Präparationen von Referenzstämmen mit bekannten kreuzreagierenden Komponenten im Mikrotiterplatten (MTP)-Assay (siehe Abschnitt 3.6.2. und 3.6.3.) getestet.

3.5.5. Kommerziell verfügbare Seren

Im Vergleich mit den eigen produzierten Testseren wurden ausgewählte Seren der Firmen SIFIN GmbH Berlin, D und SSI Kopenhagen, DK, getestet. Die verfügbaren Seren sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Testung erfolgte wie in Abschnitt 3.6.2. und 3.6.3. beschrieben.

Tabelle 3: Zur Testung nach SOP eingesetzte kommerziell verfügbare Seren

| <i>E. coli</i>-Testserum | Hersteller |
|---------------------------------|-------------------|
| O91 | SIFIN |
| O103 | SIFIN |
| O118 | SIFIN |
| O119 | SIFIN |

| | |
|------|-------|
| O125 | SIFIN |
| O126 | SIFIN |
| O128 | SIFIN |
| O145 | SIFIN |
| H2 | SSI |
| H11 | SSI |
| H31 | SSI |

3.6. Serologische Testung von *E. coli*- O- und H-Antigenen im Mikrotiterplatten-Assay

Die O- und H-Antigenpräparationen erfolgten wie unter 3.3.1., 3.5.1., 3.5.1.1. und 3.5.1.2. für die Präparation der Immunisierungssuspensionen beschrieben. Für die Präparation der Antigene von *E. coli*-Stämmen für die Serotypie wurde jedoch jeweils nur 1 Röhrchen mit 8 ml Antigen-Bouillon beimpft.

Bei Lagerung von 4°C und steriler Entnahme von Material waren diese O- und H-Antigen-Präparationen mehrere Wochen (bis zu 1 Jahr) verwendungsfähig.

3.6.1. O-Antigen-Bestimmung

Die O-Antigen-Bestimmung erfolgte im 3-Schritt-Verfahren als Agglutinationsreaktion, wobei im 1. Schritt unter Ausnutzung von Antigenverwandtschaften Testseren gruppiert werden, die mit ähnlichen Strukturen reagieren. Im 2. Schritt werden alle Einzelkomponenten einer positiv reagierenden Gruppe (Pool) getestet. Der abschließende 3. Schritt erlaubt durch Bewertung des Titers nach einer Titration positiv reagierender Einzel-Testseren, die Bestimmung des O-Typs.

3.6.1.1. Poolseren

Die Gruppierung ähnlich reagierender Testseren in sogenannten „Pools“ erfolgte analog zu den bei ØRSKOV et al. (1984) publizierten Gruppen.

Für den Einsatz in Mikrotiterplatten wurden Arbeitsverdünnungen von 1:200 hergestellt, indem je 0,5ml aller Einzelseren eines Pools mit PBS-Azid ad 100,0 ml aufgefüllt wurden. Die O-Antiserum-Pools sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: O-Antiserum-Pools

| Pool | Antiserum gegen <i>E.coli</i>-O-Ag |
|-------------|---|
| A | 1,2,50,74,149 |
| B | 3,23,28ac,38,115 |
| C | 4,16,18ab,18ac,19 |
| D | 5,7,39,65,70,71,114,116 |
| E | 6,9,30,55,57 |
| F | 8,46,60,75,93 |
| G | 17,44,77,106,111,113 |
| H | 25,26,62,68,73,102 |
| I | 12,15,40,78,87,92,96 |
| J | 13,21,22,32,34,83,85,140 |
| K | 14,20,107,117,118,123,138,148 |
| L | 86,88,90,127,128ab,141 |
| M | 10,11,24,27,28ab,29,33,36,37,41,56 |
| N | 42,43,45,48,49,51,52,54,58,59,61 |
| O | 63,64,66,69,76,79,80,81,82,112ab,144,150 |
| P | 84,89,91,95,97,98,99,100,101,103,104,105 |
| Q | 108,109,110,119,120,121,124,125ab,125ac,126,130,131 |
| R | 132,134,136,137,142,143,145,146,170 |
| S | 35,129,133,135,139,147,171,172,173 |
| T | 151,152,153,154,155,156,157 |
| U | 158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169 |
| W | 174,175,176,177,178,179,180,181 |

3.6.1.2. Agglutination

Für die Agglutinationsreaktionen wurden 96- well-Mikrotiterplatten (MTP) aus Polystyrol mit U-Boden (Greiner, D) verwendet.

Sie wurden mit je 25µl der Poolseren A-W beschickt. Zu jeder Vertiefung mit Poolserum wurde anschließend 25µl der zu testenden O-Antigen-Präparation hinzugefügt.

Anschließend wurden die Testansätze durch leichtes Schütteln der MTP durchmischt, die MTP mit Deckel verschlossen und durch Abkleben oder Aufbewahrung in Boxen vor Verdunstung geschützt. Nach Inkubation bei 50°C über Nacht konnten die Agglutinate mit Hilfe eines speziellen Ablesespiegels für MTP (Dynex, NL) ausgewertet werden.

Eine positive Reaktion war durch flächige körnige Agglutination gekennzeichnet.

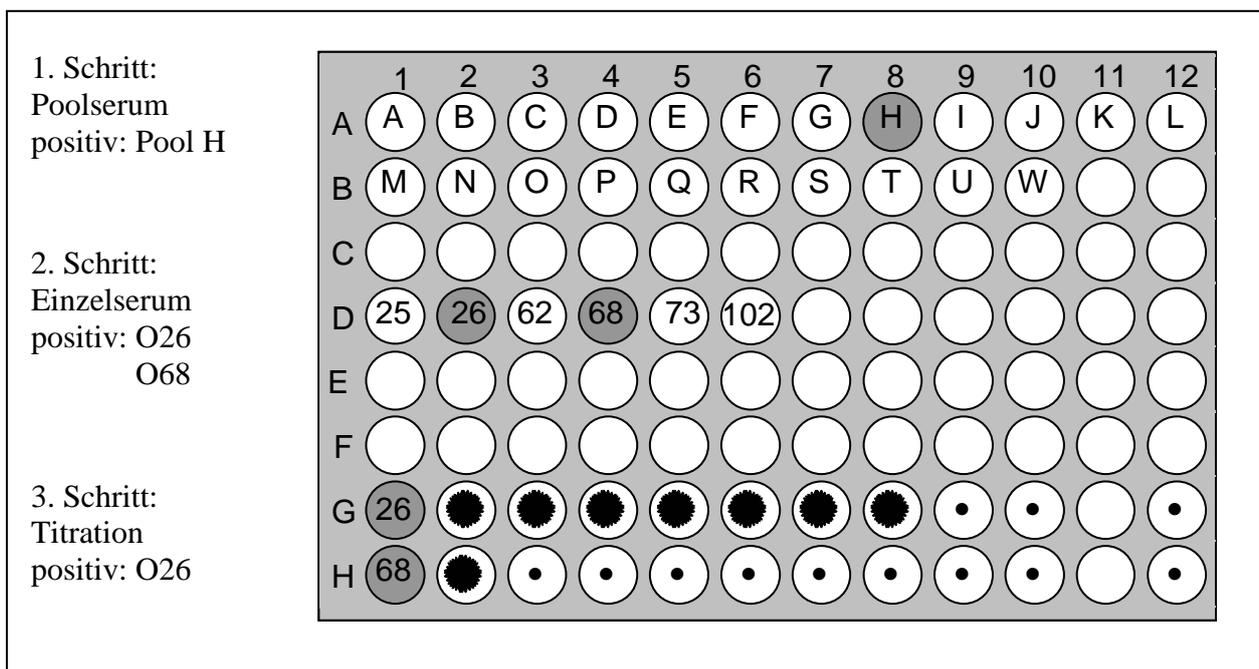
Eine negative Reaktion war durch punktförmig am Boden der U-förmigen Vertiefung zusammen gelagerten Bakterien zu identifizieren.

Anschließend wurde in gleicher Weise jedes Einzelserum mit der O-Antigen-Präparation getestet, das in dem entsprechenden positiv agglutinierenden Poolserum enthalten war.

Die Einordnung des O-Antigens wurde durch Titration der positiv bewerteten Einzelseren beginnend mit einer Verdünnung von 1:20 wie vorstehend getestet.

Zur eindeutigen Identifizierung des O-Antigens musste eine Agglutinationsreaktion bis zur 4. Titerstufe zu verzeichnen sein (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der *E. coli*-O-Antigentestung im MTP-Assay für ein *E. coli* O26-Isolat



3.6.2. H-Antigen-Bestimmung

Analog zu den unter 3.6.1. beschriebenen Verfahren wurde die Präparation der H-Antigene vorgenommen, falls das *E.coli*-Isolat positiv in der Beweglichkeitsprüfung (Abschnitt 3.3.1.) bewertet worden war.

Auch die H-Antigen-Agglutination erfolgte im beschriebenen 3-Schritt-Verfahren.

3.6.2.1. Poolseren

Ebenso wie die Testseren für die O-Antigenbestimmung wurden die Seren für die H-Antigenbestimmung in Gruppen (Poolseren), wie bei ØRSKOV und ØRSKOV (1984) publiziert, eingeordnet. Der Herstellung der Pools musste durch die z. T. hohen Titer gegen den homologen Referenzstamm folgendermaßen realisiert werden:

Pool A bis I enthielten je 5 Seren, die ad 50,0 ml mit PBS-Azid aufgefüllt wurden, nach Mischung der Einzeleren entsprechend ihrem Titer , wie folgt:

Titer 1:10000 und mehr: 0,2 ml

Titer über 1:5000: 0,4 ml

Titer über 1:2000: 1,0 ml

Titer 1:1280: 2,0 ml .

Pool J enthielt 8 Seren und wird demnach ad 80,0 ml PBS-Azid aufgefüllt.

Die Poolseren der H-Antigen-Gruppen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: H-Antiserum-Pools

| Pool | <i>E. coli</i>-H-Antigen |
|-------------|---------------------------------|
| A | 1,2,3,12,16 |
| B | 4,5,6,9,17 |
| C | 8,11,21,40,43 |
| D | 7,10,14,15,18 |
| E | 19,20,23,24,25 |
| F | 26,27,28,29,31 |
| G | 30,32,34,36,41 |
| H | 33,35,37,38,45 |
| I | 39,42,44,46,47 |
| J | 48,49,51,52,53,54,55,56 |

3.6.2.2. Agglutination

96-well-Mikrotiterplatten (MTP) aus Polystyrol mit U-Boden (Greiner, D) wurden mit je 25µl der Poolseren A-J beschickt. Pro Vertiefung wurden 25µl H-Antigen-Präparation hinzugefügt (siehe Abschnitt 3.6.1.2).

Anschließend wurden die Suspensionen in den MTP durch leichtes Schütteln gemischt, mit Deckel versehen und bei 50°C 2 Stunden inkubiert.

Die Auswertung der Agglutinate wurden die MTP auf einem speziellen Ablesespiegel für MTP (Dynex, NL) begutachtet.

Positive Reaktionen waren durch wolkige großflächige Agglutinationen gekennzeichnet.

Als negative Reaktionen wurden punktförmige Ablagerungen am Boden der U-förmigen Vertiefung bewertet (Abbildung 5).

Wie unter 3.6.1.2. für O-Antigene beschrieben, wurde auch für die Identifizierung der H-Antigene der 2. und 3. Schritt mit gleichen Bewertungskriterien durchgeführt (Abbildung 5).

3.7. LPS-Musteranalyse

Für die molekulare Analyse der serologisch bestimmten O-Antigene wurde ein Verfahren zur LPS-Musteranalyse mittels SDS-PAGE eingesetzt.

3.7.1. Präparation der LPS

Von einer Vorkultur auf TSA-Platten (klein) wurden je 2-3 Kolonien in 5 ml Nährbouillon-Röhrchen überimpft. Diese wurden im Schüttelinkubator (37°C, 150 U/min) 5 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Bouillons auf 2 große TSA-Platten ausgespatelt und diese nochmals bei 37°C über Nacht (ca. 18 h) inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurden die Platten mit 10 ml Trispuffer abgeschwemmt und die Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt.

Nach Kühlzentrifugation bei 10000 U/min für 10 min (4°C)) wurden die Sedimente in 10 ml Trispuffer aufgenommen und unter gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert.

Die Sedimente wurden anschließend in 8 ml Trispuffer aufgenommen und mittels Ultraschall (4 min, 100W, 20kHz) aufgeschlossen.

Die gewonnene Suspension wurde bei 8000U/min 15 min (4°C), und anschließend 2ml dieses Überstands bei 25000U/min für 1 h (4°C) zentrifugiert.

Die durch Abnehmen der Überstände gewonnenen Sedimente wurden in 400µl Auftragspuffer gelöst, in Eppendorf-Röhrchen überführt und nach einem Kochschritt (5 min im Wasserbad) mit 40µl Proteinase K versetzt.

Nach einer Inkubation bei 60°C für 1 Stunde (Wasserbad) waren die Präparationen für die SDS-PAGE verwendungsfähig.

3.7.2. Elektrophorese

Die Erfassung der LPS-Muster von *E. coli*-Stämmen erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE welche ein Analyseverfahren darstellt, das ausschließlich nach Molekülgröße trennt (BOLLANG und EDELSTEIN, 1991).

3.7.2.1. Präparation der SDS-PAGE-Gele

Es erfolgte eine Eigenherstellung der Gele mit einer Schichtdicke von 1 mm in Gelkammer „Multigel Long“ (Biometra, D) nach Pipettierschema wie in Tabelle 6.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Herstellung der SDS-Gele

| Trenngel (12%ig): | |
|--------------------------|---------|
| Trenngelpuffer | 12,5 ml |
| Acrylamidfertiglösung | 10,0 ml |
| SDS | 2,5 ml |
| APS | 0,63 ml |
| TEMED | 50µl |

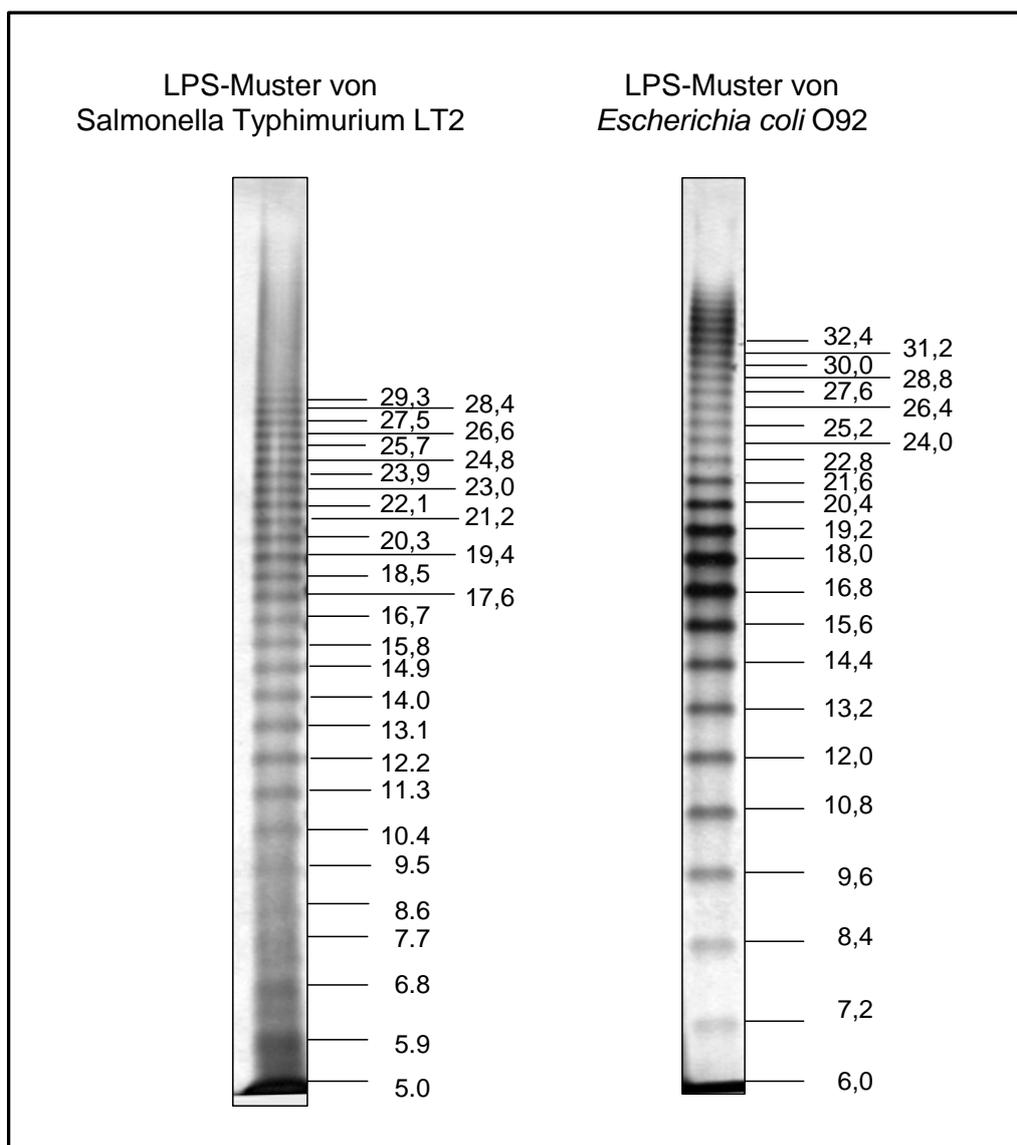
| Sammelgel (3%ig): | |
|--------------------------|---------|
| Obergelpuffer | 5,0 ml |
| Acrylamidfertiglösung | 1,5 ml |
| SDS | 0,5 ml |
| APS | 0,24 ml |
| Aqua bidest. | 3,26 ml |
| TEMED | 35µl |

3.7.2.2. Laufbedingungen

Nach dem Auftragen der Proben wurde die elektrophoretische Auftrennung mit einer Spannung von 500V und einer Stromstärke von 30mA (Sammelgel) und 40 mA (Trenngel) ca. 2 Stunden durchgeführt.

Als Standards wurden Aufarbeitungen von *E. coli* O92 und *S. Typhimurium* LT2 (= S.Tm 618) verwendet (siehe Abbildung 6). Anhand des bekannten Molekulargewichts der Repeating unit (RU) von S.Tm 618 wurde der Wert von *E. coli* O92 berechnet, und zur Auswertung der *E. coli*-Stämme herangezogen, weil auf *E. coli* Bezug genommen werden sollte (HANCOCK et al., 1994).

Abbildung 6: Standards für die Auswertung der LPS-SDS-PAGE



3.7.2.3. Färbung der Gele

Die Gele wurden mittels Silberfärbung nach TSAI und FRASCH (1982) entwickelt. Hierbei wird das SDS-PAGE-Gel in Ethanol (10%) gespült, mit 0,7% Periodsäure oxidiert. Mit 0,1% Silbernitratlösung für 20 min. wird das Gel sensibilisiert und mit dem Reduktionsmittel Formalin (3% Natriumcarbonatlösung mit 1vol% Formalin) entwickelt. Durch 1%ige Essigsäure wird die Reaktion gestoppt. Mit aqua dest. gespült, lässt sich das Gel in Cellophan einbetten und im Gelrockner (2h, 63°C) trocknen.

3.7.2.4. Auswertung der Gele

Die Auswertung der Gele erfolgte nach dem Scannen (Imaging Densitometer, Model GS-700, Bio Rad) mit dem Gel-Auswertesystem Molecular Analyst Fingerprinting Plus, Version 1.6 (Bio Rad) und Quantity One Version 4.0 (Bio Rad). Hierzu eignen sich frisch entwickelte Gele ebenso wie getrocknete.

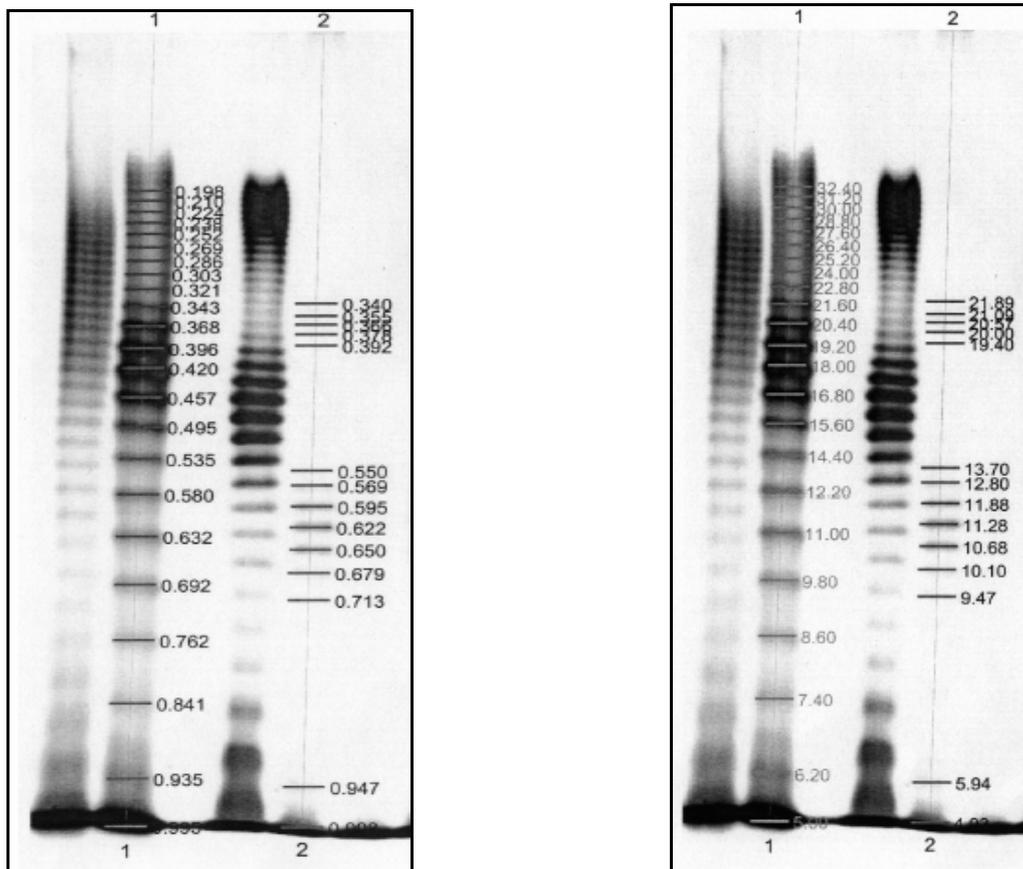
3.7.3. Computergestützte Ermittlung des Molekulargewichts der LPS-Banden

Das o. g. Gel-Auswertesystem lieferte nach Festlegung der Parameter für die Spur der Probe auf dem Gel, die Lauffront und den als Berechnungsgrundlage dienenden Standard, alle für die weitere Analyse verwendeten Daten für jedes Einzelisolat.

3.7.3.1. Ermittlung der Rf-Werte der LPS-Muster

Die Ermittlung der Rf-Werte stellte die Basis dar für die weitere Bearbeitung der Stammeigenschaften zum LPS-Mustervergleich. Nach Festlegung von Lauffront und Standard eines jeden Gels, wurden die 5 Banden eines jeden Isolats ausgewählt und markiert, die mit der stärksten Intensität sichtbar waren. Eine Überprüfung der Intensität und der Richtigkeit der Markierung war durch densitometrische Auswertung und Festlegung von Grenzen innerhalb bestimmter Minimum- und Maximumwerte durch die Auswerte-Software gegeben (Abbildung 8). Durch Vergleich dieser Bandenparameter mit dem Standard wurden daraus Rf-Werte berechnet, aus denen wiederum das Molekulargewicht für jede einzelne Bande ermittelt werden konnte. Abbildung 7 soll diese Ermittlung schematisch darstellen.

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ermittlung von Rf- und MW-Werten

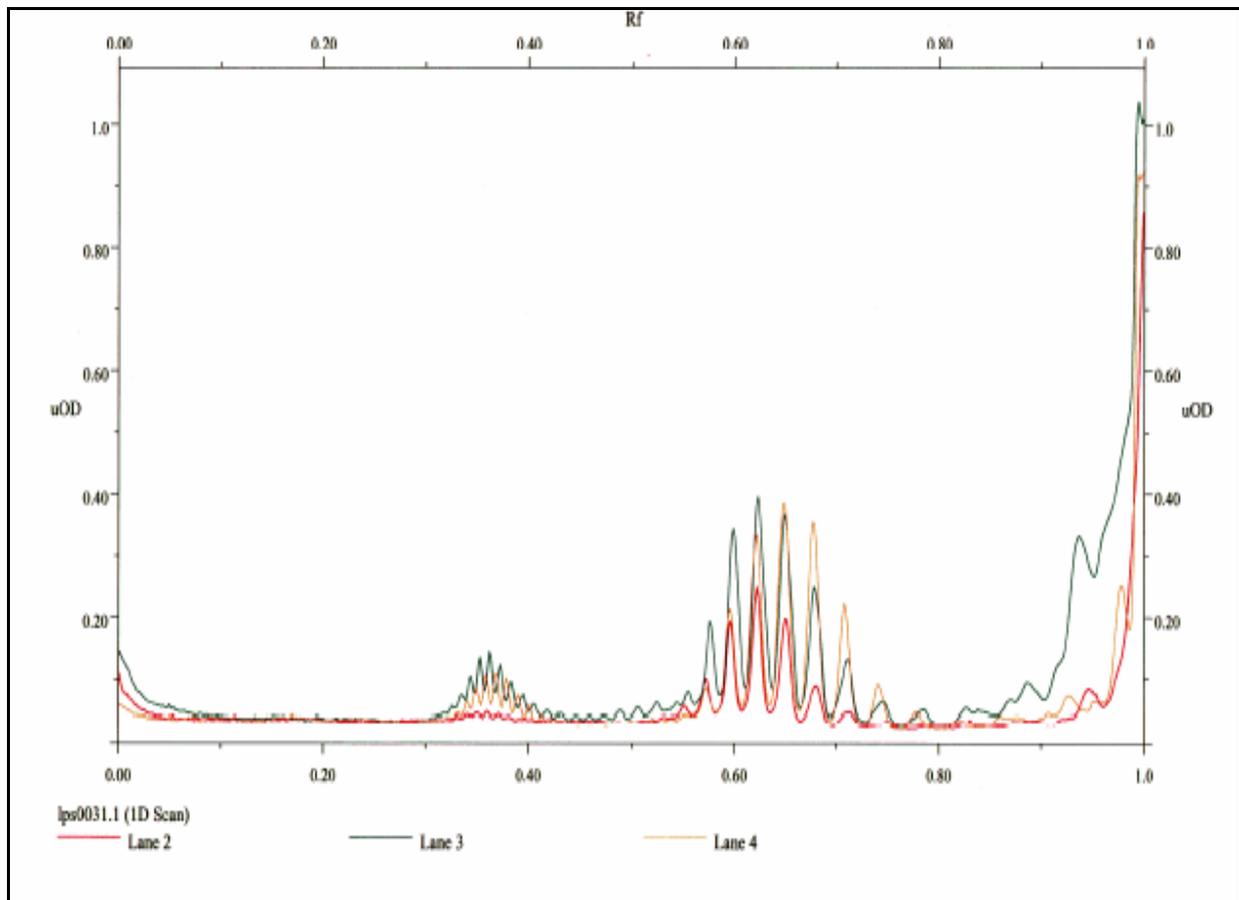


Rf-Werte: *E. coli* O92 *E. coli* 03-03651

Molekulargewichtswerte der LPS-Banden
in Relation zum Standard *E. coli* O92

In Abbildung 8 ist die Intensität der Banden anhand eines Densitogramms von 3 *E. coli* Ont-Stämmen beispielhaft dargestellt. Die 5 aufeinanderfolgenden Banden mit der größten Intensität wurden für die weitere Auswertung der LPS-Muster verwendet. Mit Hilfe des Programms Quantity One 4.0 (Bio Rad) konnte in diesen Desitogrammen außerdem der direkte Mustervergleich von Stämmen eines Gels (bis zu 10 Stämme) erfolgen, da die Lage der Banden anhand ihres Rf-Wertes dargestellt wurde.

Abbildung 8: Densitogramm der LPS-Muster von 3 *E. coli* Ont:H- Isolaten
(nach HECKE, 2004)



3.7.3.2. Molekulargewicht der Repeating unit (RU)

Die Analyse der LPS-Muster erfolgte durch Vergleich einer erstellten Referenzmusterdatei für alle *E. coli*-O-Typstämme der Referenzstammsammlung WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, (Anhang 1) mit dem jeweiligen zu untersuchenden Muster. Zusätzlich wurde das Molekulargewicht der RU ermittelt, um individuelle Stammeigenschaften (z.B. Polymeraseaktivität bei der LPS-Expression) näher untersuchen zu können. Hierzu wurden Differenzen aus den Molekulargewichten der 5 aufeinander folgenden Banden mit der stärksten Intensität gebildet. Der Durchschnitt aus diesen Werten ergab das für das O-Antigen des Stammes typische Molekulargewicht der RU. Innerhalb einer Gruppe von Stämmen gleichen Serovars bzw. gleicher LPS-Muster (z.B. Ont-Stämme, siehe Abschnitt 4.1.6.8.) konnten so jeweils Serotyp-Konstante numerische Werte für den O-Antigen-Polymorphismus erfasst werden.

3.8. PCR und RFLP des *fliC*-Gens

Die Bestimmung des Polymorphismus des *fliC*-Gens zur Erfassung von H-Antigenen erfolgte wie bei PRAGER, R., STRUTZ, U., FRUTH, A., TSCHÄPE, H. (2003) bereits publiziert. Für die PCR wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Primersequenzen verwendet, für die Erfassung der *fliC*-RFLP wurden die Enzyme RsaI und CfoI eingesetzt.

Tabelle 7: PCR-Primer zur Verwendung in der *fliC*-PCR

| Bezeichnung | Primersequenz | Referenz |
|------------------|---|---------------------------|
| F-FLIC1 | 5'-atg gca caa gtc att aat acc caa c-3' | FIELDS, P.I. et al., 1997 |
| R-FLIC2 | 5'-cta acc ctg cag ca gaga ca-3' | |
| <i>fliC</i> -up | 5'-caa gtc att aat ac(a/c) aac agc c-3' | MACHADO, J. et al., 2000 |
| <i>fliC</i> -rev | 5'-gac at(a/g) tt (a/g) ga(g/a/c) act tc(g/c) gt-3' | |

3.9. Biostatistik

Die Ermittlung der biometrischer bzw. statistischer Größen erfolgte nach KÖHLER et al., 1992.

3.10. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden im Anhang 6 aufgelistet.

3.11. Geräte

Soweit im Text nicht beschrieben wurden alle verwendeten Geräte in Anhang 7 aufgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. O-Antigene

4.1.1. Ausbildung der O-Antigene

Anhand der biochemischen Besonderheiten der Gattung *Escherichia* wurden verschiedene Inkubationsbedingungen für die Ausbildung der O-Antigene getestet. Hierzu wurden Stämme aus der Stammsammlung des NRZ und Stämme der Referenzstammsammlung der WHO-Zentrale Kopenhagen, DK, verwendet.

Für die Präparation der O-Antigene wurden der Einfluß von festen Nährmedien (Nähragar, Enterohämolsinagar) und flüssige Nährmedien geprüft (Zusammensetzung siehe Anhang 5). Es wurden zusätzlich 166 Stämme aus der Stammsammlung des NRZ verwendet (in Anhang 3 enthalten).

Zwischen beiden getesteten festen Nährmedien konnten keine Unterschiede für die Ausbildung der O-Antigene festgestellt werden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Als Maß diente die serologische Prüfung mit dem homologen Testserum und die daraus ermittelte Titerhöhe für eine positive Agglutinationsreaktion, wie in Abschnitt 3 bei Material und Methoden beschrieben.

Für die weitere Bearbeitung wurde zur Vorkultur der Stämme und zur Ausbildung der O-Antigene der Enterohämolsinagar ausgewählt, da für die Durchführung der Serotypie von *E. coli* ein Vorteil darin zu sehen war, dass das Wachstum der *E. coli*-Kolonien hinsichtlich der Morphologie und Einheitlichkeit sehr gut bewerten war.

4.1.2. Optimale Keimkonzentration

Zur Prüfung der aus Anreicherung in Flüssigmedium gewonnenen Antigenmenge wurden 38 *E. coli*-Stämme der Serovare O103:H2 und O91: H⁻, O91:H14, O91:H21 angezüchtet (siehe Abschnitt 3.6.1.). Die Auflistung der Stämme und die Ergebnisse der serotypischen Testung der O-Antigene sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Bei Verwendung einer Keimzahl von $2,5 \times 10^9$ KBE, welche sich aus der Animpfmenge von 1 KBE auf 5 ml Antigenbouillon nach Inkubation bei 37°C über Nacht ergab, konnte für Agglutinationsreaktion der *E. coli*-Stämme des Serovars O103 eine Titerstufe von 5 bestimmt

werden (Mittelwert von 5,37). Der Einsatz einer auf $1,5 \times 10^9$ KBE verdünnten Antigenbouillon führte zu einer Erhöhung der Titerstufe auf 6 (Mittelwert von 6,32). Die *E. coli*-Stämme des Serovars O91 wurden mit einer Titerstufe von 5 (Mittelwert von 4,89) bei Verwendung von $2,5 \times 10^9$ KBE eindeutig serotypisch determiniert. Bei Verdünnung dieser Antigenbouillon auf $1,5 \times 10^9$ KBE wurde ebenfalls eine Erhöhung der Titerstufe beobachtet. Hier wurde die Titerstufe 7 ermittelt (Mittelwert von 6,79). Es wurde hieraus abgeleitet, dass die einzusetzende Konzentration der Antigenbouillon von $2,5 \times 10^9$ KBE für den serotypischen Nachweis geeignet ist.

Tabelle 8: Einfluß von KBE auf die Titerstufen bei der serotypischen Identifizierung von *E. coli*-Stämmen

| RKI-Nr. | Serovar | OD 620 nm | KBE in n x 10 ⁹ | Titer Original | Titer 1,5 x 10 ⁹ |
|------------|--------------------|-----------|----------------------------|----------------|-----------------------------|
| 04-04558 | O103:H2 | 1,42 | 2,07 | 5 | 6 |
| 04-04643-2 | O103:H2 | 1,62 | 2,37 | 5 | 6 |
| 04-04669 | O103:H2 | 1,59 | 2,32 | 5 | 7 |
| 04-04786 | O103:H2 | 1,58 | 2,31 | 5 | 6 |
| 04-04787 | O103:H2 | 1,55 | 2,27 | 8 | 8 |
| 04-04832 | O103:H2 | 1,68 | 2,45 | 8 | 7 |
| 04-04852 | O103:H2 | 1,65 | 2,40 | 5 | 6 |
| 04-04952 | O103:H2 | 1,48 | 2,16 | 5 | 6 |
| 04-06251 | O103:H2 | 1,54 | 2,25 | 5 | 6 |
| 04-06259 | O103:H2 | 1,62 | 2,36 | 5 | 6 |
| 04-06352 | O103:H2 | 1,48 | 2,15 | 5 | 6 |
| 04-06561 | O103:H2 | 1,50 | 2,18 | 5 | 7 |
| 04-06948 | O103:H2 | 1,47 | 2,15 | 5 | 6 |
| 04-07079 | O103:H2 | 1,53 | 2,23 | 5 | 7 |
| 04-07474 | O103:H2 | 1,58 | 2,30 | 5 | 6 |
| 04-07771 | O103:H2 | 1,54 | 2,25 | 5 | 6 |
| 04-07852 | O103:H2 | 1,59 | 2,32 | 6 | 6 |
| 04-08052 | O103:H2 | 1,56 | 2,28 | 5 | 6 |
| 04-08708 | O103:H2 | 1,53 | 2,23 | 5 | 6 |
| | | | Mittelwert | 5,37 | 6,32 |
| 04-05981 | O91:H ⁻ | 1,61 | 2,35 | 5 | 7 |
| 04-05995 | O91:H21 | 1,54 | 2,24 | 5 | 7 |
| 04-06003 | O91:H21 | 1,64 | 2,38 | 5 | 8 |
| 04-06056 | O91:H ⁻ | 1,63 | 2,37 | 6 | 7 |
| 04-06267 | O91:H14 | 1,44 | 2,10 | 5 | 7 |
| 04-06269 | O91:H14 | 1,46 | 2,13 | 5 | 7 |
| 04-06837 | O91:H ⁻ | 1,55 | 2,27 | 4 | 6 |
| 04-06889-1 | O91:H ⁻ | 1,65 | 2,41 | 4 | 6 |
| 04-06952 | O91:H21 | 1,58 | 2,30 | 5 | 7 |
| 04-07247 | O91:H ⁻ | 1,57 | 2,28 | 5 | 7 |
| 04-07248 | O91:H21 | 1,71 | 2,50 | 4 | 7 |

| RKI-Nr. | Serovar | OD 620 nm | KBE in n x 10 ⁹ | Titer Original | Titer 1,5 x 10 ⁹ |
|----------|--------------------|-----------|----------------------------|----------------|-----------------------------|
| 04-07302 | O91:Hnt | 1,70 | 2,47 | 6 | 6 |
| 04-07509 | O91:H ⁻ | 1,73 | 2,52 | 4 | 6 |
| 04-07841 | O91:H14 | 1,52 | 2,22 | 5 | 7 |
| 04-07956 | O91:H ⁻ | 1,60 | 2,33 | 5 | 7 |
| 04-08127 | O91:H14 | 1,62 | 2,36 | 5 | 6 |
| 04-08408 | O91:H ⁻ | 1,62 | 2,36 | 5 | 7 |
| 04-08564 | O91:H14 | 1,38 | 2,01 | 5 | 7 |
| 04-08566 | O91:H ⁻ | 1,69 | 2,46 | 5 | 7 |
| | | | Mittelwert | 4,89 | 6,79 |

Die Anwesenheit von Kapsel- (K)-Antigenen erschwert für einige *E. coli*-Isolate den eindeutigen Nachweis der O-Antigene. Hitzelabile K-Antigene werden durch die standardmäßige Behandlung der Antigenbouillon nach der Anzucht bei 100°C für 1 Stunde zerstört. Für den Anteil der *E. coli*-Isolate mit hitzestabilen K-Antigenen konnte erfolgreich die Methode zur Erzeugung so genannter K⁻-Formen (kapselfreie Formen) mit Hilfe von Nähragar eingesetzt werden (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984). Es zeigte sich, dass auch bei intestinalen pathogenen *Escherichia coli* häufiger Kapseln zu finden sind, als bisher bekannt. Die in Tabelle 9 aufgeführten, nach Präparation von K⁻-Formen serotypisch definierbare, Isolate gehörten dem Pathovar EHEC an.

Tabelle 9: Vergleich von Serotypie-Ergebnissen kapseltragender *E.coli*-Isolate und ihren isogenen kapselfreien Formen

| RKI-Nr. | O-Antigen | Titerstufe positiver Agglutination mit homologem Testserum (K ⁺ -Form) | Titerstufe positiver Agglutination mit homologem Testserum (K ⁻ -Form) |
|----------|-----------|---|---|
| 03-02519 | 100 | 1 | 7 |
| 03-02525 | 100 | 1 | 5 |
| 03-02527 | 100 | 1 | 4 |
| 03-02529 | 9 | 0 | 6 |
| 03-04880 | 8 | 0 | 9 |

4.1.3. Herstellung der Testseren

Alle Testseren für die *E.coli*-O-Antigene 1-181 liegen nach Eigenherstellung vor (siehe Abschnitt 3.5.).

4.1.4. Charakterisierung der Kreuzreaktivität

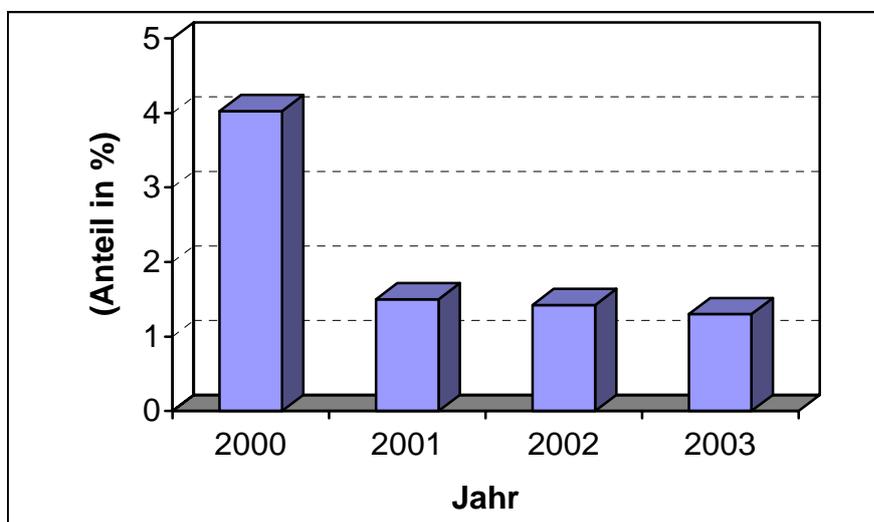
Für die Isolate aus Einsendungen an das NRZ wurden die in der O-Antigen-Bestimmung mittels MTP-Agglutination ermittelten Kreuzreaktionen dokumentiert. Neben den bereits bei ØRSKOV und ØRSKOV (1984) publizierten Reaktionen, wurden mit dem Testserum-Set weitere Kreuzreaktionen beobachtet. In Tabelle 10 sind die Testseren aufgeführt, die mehrere O-Antigene anzeigen.

Im Verlauf der Optimierung des Verfahrens zur Erstellung der Standard Operation Procedure (SOP) wurden die dokumentierten Kreuzreaktionen seltener, in Auftreten und Stärke, beobachtet. In Abbildung 9 ist dieser Verlauf aus den Jahren 2000 bis 2003 schematisch dargestellt.

Tabelle 10: Kreuzreagierende Antiseren aus dem Testserum-Set des NRZ

| O-Testserum | O-Antigen |
|-------------|-----------|
| 5 | 5, 21 |
| 15 | 15, 25 |
| 15 | 15, 145 |
| 26 | 26, 158 |
| 23 | 23, 14 |

Abbildung 9 : Anteil der *E.coli*-Isolate mit dokumentierten Kreuzreaktionen aus Einsendungen an das NRZ der Jahre 2000-2003



Besonders häufig auftretende Kreuzreaktionen bei *E. coli*-Isolaten aus Patientenmaterial sind Anhand von Einzelbeispielen aus den Jahren 2001 und 2003 in Tabelle 11 dargestellt. Die O-Antigene O2, O5, O15, O17, O23, O25, O26, O68, O76, O77, O115, O127 waren bei den bearbeiteten intestinalen *E. coli*-Isolaten von zentraler Bedeutung. Ihre serotypische Identifizierung erfolgte durch Kombination mit der LPS-Musteranalyse, wie in Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 11: Häufig aufgetretene Kreuzreaktionen bei *E. coli*-Isolaten aus Patientenmaterial

| RKI-Nr. | O-Antigen | Titerstufe positiver Agglutination mit homologem Testserum | Reaktion mit absorbiertem Testserum |
|----------|-----------|--|-------------------------------------|
| 01-03033 | 5 | 7 | + |
| | 65 | 5 | - |
| | 70 | 4 | - |
| | 21 | 4 | - |
| 01-03043 | 15 | 6 | + |
| | 25 | 3 | - |
| 01-04787 | 74 | 5 | - |
| | 2 | 7 | + |
| 01-07319 | 17 | 6 | + |
| | 77 | 4 | - |
| | 106 | 6 | - |
| 01-09057 | 15 | 8 | + |
| | 40 | 5 | - |
| | 145 | 6 | - |
| 01-09096 | 25 | 4 | + |
| | 15 | 4 | - |
| | 45 | 4 | - |
| 01-09102 | 68 | 5 | + |
| | 73 | 3 | - |
| 01-09520 | 17 | 5 | + |
| | 106 | 5 | - |
| 01-09937 | 15 | 6 | + |
| | 40 | 6 | - |
| 01-09938 | 5 | 10 | + |
| | 65 | 2 | - |

| RKI-Nr. | O-Antigen | Titerstufe positiver Agglutination mit homologem Testserum | Reaktion mit absorbiertem Testserum |
|----------|------------|--|-------------------------------------|
| | 21 | 3 | - |
| 01-12336 | 26 | 6 | + |
| | 158 | 6 | - |
| 03-02920 | 23 | 6 | + |
| | 73 | 2 | - |
| 03-02991 | 115 | 7 | + |
| | 98 | 3 | - |
| 03-05007 | 5 | 9 | + |
| | 21 | 4 | - |
| 03-05415 | 26 | 4 | + |
| | 158 | 2 | - |
| 03-05539 | 77 | 5 | + |
| | 106 | 1 | - |
| 03-05768 | 5 | 8 | + |
| | 21 | 3 | - |
| 03-06306 | 23 | 5 | + |
| | 14 | 3 | - |
| 03-06312 | 90 | 7 | - |
| | 127 | 7 | + |
| 03-06367 | 76 | 7 | + |
| | 22 | 2 | - |

4.1.5. Anwendung kommerzieller Testseren zur O-Antigen-Bestimmung

Zur Bestimmung der *E. coli* O-Antigene wurden kommerziell verfügbare Testseren auf ihre Eignung geprüft. Diese Seren werden in einer Gebrauchsverdünnung für die Objektträgeragglutination angeboten. Diese Form der Testung hat sich auf Grund der vielfältigen kreuzreagierenden Antikörper, welche in diesen polyklonalen Seren (i.d.R. Kaninchenserum) vorhanden sind, nicht bewährt.

Deshalb wurden Testseren für *E. coli* O-Antigene O91, O103, O118, O119, O125ab, O126, O128ab, O145 (Fa. SIFIN GmbH Berlin, D) im Verfahren auf MTP mit den homologen Referenzstämmen der Stammsammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, und Isolaten aus Routineeinsendungen des NRZ eingesetzt.

Es konnten 49 von 53 Stämmen eindeutig bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Insbesondere die Stämme des Serovars O91 und O145 wurden nur zu 89% bzw. 70% nachgewiesen. Hier konnte eine chargenabhängige Sensitivität nicht ausgeschlossen werden. Die Menge eindeutig nachzuweisender spezifischer O-Antigene (LPS) differiert bei Wildtypstämmen stark und daher ist ein Abgleich der Seren aus der Herstellung mit den Referenzstämmen notwendig.

Tabelle 12: Anwendung kommerziell verfügbarer Testseren (Fa. SIFIN GmbH Berlin, D) im Mikrotiterplattenassay zur O-Antigenbestimmung von *E. coli*

| O91 | | Titerstufe MTP-Assay |
|-------------|--------------------|--------------------------|
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 1541001 |
| H 307b | O91:H ⁻ | 7 |
| 97-10581-1 | O91:H14 | 4 |
| 03-02448 | O91:H21 | 6 |
| 03-02449 | O91:H21 | 8 |
| 03-02477 | O91:H ⁻ | 0 |
| 03-02672-2 | O91:H ⁻ | 7 |
| 03-02815 | O91:H ⁻ | 6 |
| 03-02817 | O91:H14 | 6 |
| 03-02951 | O91:H14 | 7 |
| O103 | | Titerstufe MTP-Assay |
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 800601 |
| H 115b | O103:H8 | 6 |
| 03-02460 | O103:H2 | 6 |
| 03-02501 | O103:H2 | 6 |
| 03-02558 | O103:H2 | 7 |
| 03-02592 | O103:H2 | 6 |
| 03-02593 | O103:H2 | 5 |
| 03-02801 | O103:H2 | 6 |
| 03-02843 | O103:H2 | 6 |
| 03-02816 | O103:H2 | 6 |
| 03-02890 | O103:H2 | 6 |
| 03-02911 | O103:H2 | 5 |
| 03-02956 | O103:H2 | 6 |

| | | |
|---------------|-----------------------|--------------------------|
| O118 | | Titerstufe MTP-Assay |
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 1400800 |
| W31 | O118:H ⁻ | 10 |
| 03-02446 | O118:H16 | 2 |
| 03-01590 | O118:H16 | 8 |
| 03-00917 | O118:H8 | 7 |
| 02-05062 | O118:Hnt | 7 |
| 02-02173 | O118:H16 | 7 |
| 03-02655-1 | O118:H16 | 10 |
| 03-02655-2 | O118:H16 | 8 |
| 03-02671-1 | O118:H ⁻ | 9 |
| O119 | | Titerstufe MTP-Assay |
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 680593 |
| W 34 | O119:H27 | 6 |
| 00-03235 | O119:H25 | 9 |
| 00-02973 | O119:H2 | 7 |
| 00-00723 | O119:H25 | 7 |
| O125ab | | Titerstufe MTP-Assay |
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 591294 |
| Canioni | O125ab:H19 | 7 |
| 00-00712 | O125ab:H6 | 9 |
| 01-00789 | O125ab:H6 | 9 |
| O126 | | Titerstufe MTP-Assay |
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 450995 |
| E 611 | O126:H2 | 6 |
| 00-00848 | O126:H ⁻ | 7 |
| O128ab | | Titerstufe MTP-Assay |
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 611294 |
| Cyleris | O128ab:H2 | 7 |
| 00-10885 | O128ab:H2 | 9 |
| 01-01376 | O128ab:H ⁻ | 6 |
| 01-00499 | O128ab:H2 | 6 |

| O145 | | Titerstufe MTP-Assay |
|-------------|----------------------|-------------------------|
| Stamm-Nr. | Serovar | Testserum Charge 420302 |
| E1385 (3) | O145:H ⁻ | 7 |
| 03-02478 | O145:H ⁻ | 1 |
| 03-02506 | O145:H ⁻ | 6 |
| 03-02507 | O145:H ₂₅ | 2 |
| 03-02510-1 | O145:H ⁻ | 2 |
| 03-02664 | O145:H ⁻ | 8 |
| 03-02669 | O145:H ⁻ | 7 |
| 03-02670 | O145:H ⁻ | 7 |
| 03-02867 | O145:H ⁻ | 6 |
| 03-02868 | O145:H ⁻ | 6 |

4.1.6. Molekulare Charakterisierung mittels LPS-Musteranalyse

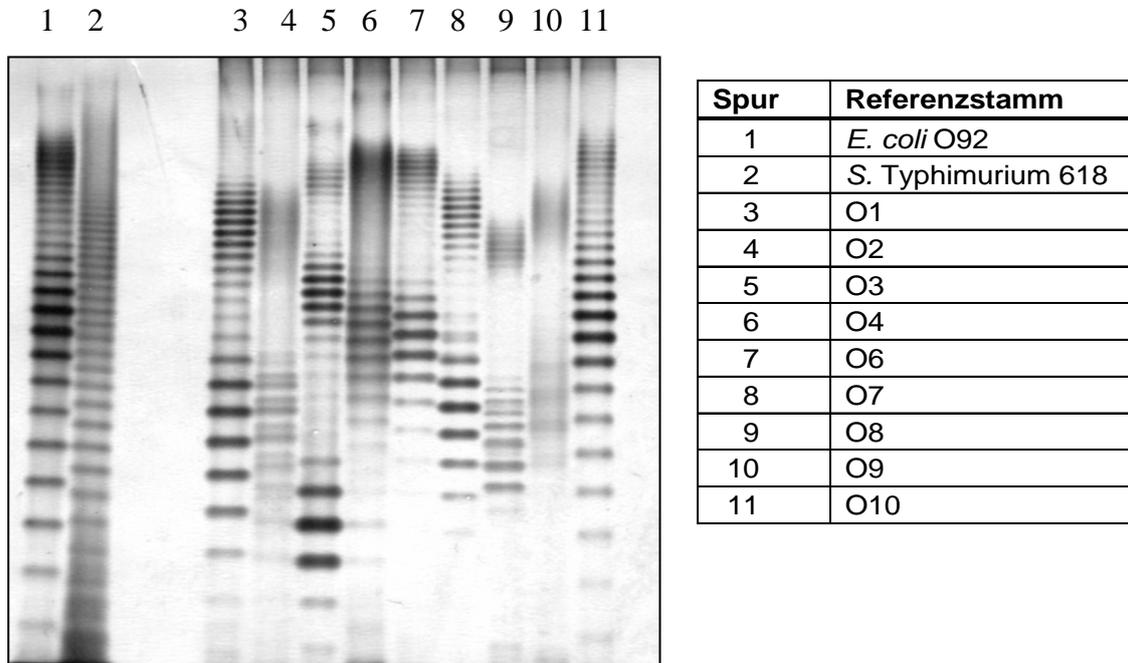
Die molekulare Charakterisierung der O-Antigene von *E. coli*-Isolaten erfolgte mit Hilfe der Analyse der LPS-Muster im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE). Hierzu wurden LPS-Präparationen, wie in Abschnitt 3 unter Material und Methoden beschrieben, bearbeitet. Als Grundlage für die Mustererkennung wurden die Referenzstämme für die O-Antigene O1 bis O181 aus der Referenzstammsammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* Kopenhagen, DK, eingesetzt. Es wurde aus den gewonnenen Daten eine Musterdatei erstellt. Für jeden O-Typ konnte ein numerischer Wert für das Molekulargewicht der RU ermittelt werden. Dieser Wert diente neben dem Original-Muster jedes einzelnen O-Typs der molekularen Beschreibung der O-Typ-charakteristischen Merkmale.

4.1.6.1. Ermittlung der LPS-Muster der Referenzstammsammlung

Von jedem Referenzstamm für die serotypische Bestimmung von O-Antigenen wurde entsprechend der beschriebenen Methode (Abschnitt 3.) ein SDS-PAGE-Gel angefertigt. Als Ergebnis wurden die charakteristischen LPS-Muster in einer Datei zusammengefügt und als Grundlage für die Analyse von O-Antigenen der klinischen *E. coli*-Isolate verwendet. Einen Ausschnitt dieser Sammlung zeigt das Beispiel der *E. coli*-O-Typen O1 bis O10 in Abbildung 10.

Die Referenzstämme waren durch differente, aber typ-spezifisch charakteristische LPS-Muster gekennzeichnet.

Abbildung 10: LPS-Muster einiger *E. coli*-O-Typstämme der Referenzstammsammlung



Jedes Muster konnte durch die Lage der Banden im SDS-PAGE-Gel, die relative Häufigkeit der RU, die Intensität der Banden und deren Molekulargewicht, sowie dem Auftreten von Doppelbanden beschrieben werden. Es wurde eine große Variationsbreite auswertbarer Banden beobachtet (3 bis 30). Ihre Anzahl spielte für die weitere Betrachtung aber keine Rolle (siehe Diskussion). Wie in Abschnitt 3 beschrieben wurden die 5 Banden mit der höchsten Dichte ausgewählt und für die weitere Berechnung herangezogen.

War die Anzahl auswertbarer Banden ≤ 5 , konnte durch Wiederholung mit Probenmenge beim Auftragen der LPS-Proben auf das SDS-PAGE-Gel für die meisten Referenzmuster eine Intensivierung der Banden erzielt werden, welches die bessere Auswertung der LPS-Muster ermöglichte. Für die Referenzstämme der Serovare O143, O150, O162, O168 und O169 wurden konstant 4 Banden ermittelt und auf ihrer Basis die Größe der RU bestimmt. Diese Stämme zeigten im mehreren separaten LPS-Präparationen dieses charakteristische Bild und dürfte somit ein jeweils O-typisches Merkmal sein.

Die LPS-Referenzmustersammlung ist im Anhang 32 aufgeführt.

Eine Auflistung aller ermittelten RU-Werte (in kDa) der *Escherichia coli* Referenzstammsammlung für O-Antigen-Serotypie erfolgte in Tabelle 13.

Tabelle 13: RU-Werte (in kDa) der Stämme aus der Referenzstammsammlung für *Escherichia coli* mit den dazugehörigen Rf-Werten der LPS-Muster nach SDS-PAGE

| O-Antigen | Referenzstamm (O:K:H-Antigenformel) | Rf-Werte der Hauptbanden | RU-Wert in kDa |
|-----------|-------------------------------------|--|----------------|
| O 1 | O1:K1:H7 | 0.435 0.394 0.361 0.325 0.295 | 1,380 |
| O 2 | O2:K1:H4 | 0.650-0.635 0.606-0.589 0.564-0.548 0.524-0.513 0.490-0.479 | 1,210-1,220 |
| O 3 | O3:K2ab:H2 | 0.878 0.812 0.750 0.696 0.648 | 0,920 |
| O 4 | O4:K3:H5 | 0.507 0.476 0.446 0.395 0.374 | 1,050 |
| O 5 | O5:K4:H4 | 0.448 0.422 0.398 0.379 0.361 | 0,760 |
| O 6 | O6:K2a:H1 | 0.498 0.462 0.429 0.399 0.370 | 1,010 |
| O 7 | O7:K1:H- | 0.657 0.608 0.565 0.525 0.488 | 1,230 |
| O 8 | O8:K8:H4 | 0.463 0.434 0.406 0.386 0.371 | 0,684 |
| O 9 | O9:K9:H12 | 0.644 0.585 0.570 0.539 0.527 | 0,410 |
| O 10 | O10:K5:H4 | 0.523 0.480 0.442 0.408 0.376 | 1,230 |
| O 11 | O11:K10:H10 | 0.476 0.441 0.410 0.382 0.355 | 1,010 |
| O 12 | O12:K5:H- | 0.658 0.624 0.593 0.562 0.534 | 0,680 |
| O 13 | O13:K11:H11 | 0.461 0.428 0.398 0.370 0.345 | 0,910 |
| O 14 | O14:K7:H- | 0.457 0.424 0.334 0.367 0.342 | 0,870 |
| O 15 | O15:K14:H4 | 0.516 0.488 0.462 0.437 0.413 | 0,810 |
| O 16 | O16:K1:H- | 0.911 0.865 0.815 0.777 0.755 | 0,570 |
| O 17 | O17:K16:H18 | 0.339 0.314 0.291 0.269 0.249 | 1,110 |
| O 18ac | O18ac:K77:H7 | 0.537 0.493 0.452 0.416 0.382 | 1,220 |
| O 19ab | O19ab:K-:H7 | 0.527 0.487 0.445 0.475 0.371 | 0,710 |
| O 20 | O20:K17:H- | 0.445 0.422 0.418 0.408 0.388 | 0,240 |
| O 21 | O21:K20:H- | 0.507 0.465 0.427 0.393 0.360 | 1,210 |
| O 22 | O22:K13:H1 | 0.608 0.536 0.524 0.487 0.454 | 1,010 |
| O 23 | O23:K18:H15 | 0.561 0.513 0.471 0.432 0.396 | 1,220 |
| O 25 | O25:K19:H12 | 0.563 0.516 0.476 0.438 0.404 | 1,220 |
| O 26 | O26:K60:H- | 0.377 0.361 0.347 0.332 0.316 | 0,605 |
| O 27 | O27:K-:H- | 0.509 0.471 0.434 0.401 0.373 | 1,000 |
| O 28 | O28ac:K73:H- | 0.667 0.639 0.610 0.582 0.556 | 0,580 |
| O 29 | O29:K-:H10 | 0.541 0.514 0.467 0.405 0.442 | 0,730 |
| O 30 | O30:K-:H-: | 0.918 0.885 0.850 0.818 0.787 | 0,470 |
| O 32 | O32:K-:H19 | 0.539 0.510 0.487 0.462 0.438 | 0,710 |
| O 33 | O33:K-:H- | 0.651 0.621 0.539 0.566 0.539 | 0,650 |

| O-Antigen | Referenzstamm (O:K:H-Antigenformel) | Rf-Werte der Hauptbanden | | | | | RU-Wert in kDa |
|-----------|--|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| O 34 | O34:K-:H10 | 0.479 | 0.450 | 0.423 | 0.389 | 0.374 | 0,890 |
| O 35 | O35:K-:H10 | 0.738 | 0.678 | 0.633 | 0.590 | 0.552 | 0,860 |
| O 36 | O36:K-:H9 | 0.708 | 0.661 | 0.617 | 0.577 | 0.539 | 0,890 |
| O 37 | O37:K-:H19 | 0.713 | 0.665 | 0.620 | 0.579 | 0.541 | 0,910 |
| O 38 | O38:K-:H26 | 0.705 | 0.663 | 0.625 | 0.589 | 0.556 | 0,610 |
| O 39 | O39:K-:H- | 0.274 | 0.252 | 0.230 | 0.211 | 0.191 | 0,785 |
| O 40 | O40:K-:H4 | 0.557 | 0.512 | 0.471 | 0.434 | 0.399 | 1,330 |
| O 41 | O41:K-:H40 | 0.652 | 0.617 | 0.586 | 0.556 | 0.529 | 0,760 |
| O 42 | O42:K-:H37 | 0.647 | 0.613 | 0.581 | 0.552 | 0.529 | 0,660 |
| O 43 | O43:K-:H2 | 0.576 | 0.538 | 0.504 | 0.473 | 0.444 | 0,850 |
| O 44 | O44:H18 | 0.339 | 0.316 | 0.293 | 0.273 | 0.253 | 0,814 |
| O 45 | O45:K1:H10 | 0.555 | 0.528 | 0.506 | 0.485 | 0.464 | 0,820 |
| O 46 | O46:K-:H16 | 0.661 | 0.630 | 0.602 | 0.573 | 0.547 | 0,520 |
| O 48 | O48:K-:H- | 0.335 | 0.311 | 0.289 | 0.267 | 0.247 | 0,840 |
| O 49 | O49:K+:H12 | 0.603 | 0.571 | 0.540 | 0.512 | 0.485 | 0,830 |
| O 50 | O50:K-:H24 | 0.867 | 0.809 | 0.755 | 0.706 | 0.658 | 0,810 |
| O 51 | O51:K12:H24 | 0.608 | 0.568 | 0.531 | 0.496 | 0.464 | 0,960 |
| O 52 | O52:K-:H10 | 0.878 | 0.852 | 0.827 | 0.802 | 0.776 | 0,340 |
| O 53 | O53:K-:H3 | 0.585 | 0.551 | 0.520 | 0.494 | 0.468 | 1,107 |
| O 54 | O54:K-:H2 | 0.654 | 0.621 | 0.590 | 0.562 | 0.533 | 0,770 |
| O 55 | O55:K59:H- | 0.610 | 0.574 | 0.540 | 0.509 | 0.480 | 0,702 |
| O 56 | O56:K+:H- | 0.682 | 0.642 | 0.605 | 0.573 | 0.539 | 0,890 |
| O 57 | O57:K-:H- | 0.928 | 0.858 | 0.802 | 0.746 | 0.691 | 2,243 |
| O 58 | O58:K-:H27 | 0.627 | 0.601 | 0.575 | 0.550 | 0.527 | 0,890 |
| O 59 | O59:K-:H19 | 0.671 | 0.646 | 0.621 | 0.593 | 0.573 | 0,630 |
| O 60 | O60:K-:H33 | 0.424 | 0.390 | 0.362 | 0.335 | 0.312 | 1,090 |
| O 61 | O61:K-:H19 | 0.795 | 0.765 | 0.739 | 0.713 | 0.685 | 0,480 |
| O 62 | O62:K-:H30 | 0.397 | 0.370 | 0.345 | 0.323 | 0.295 | 1,000 |
| O 63 | O63:K-:H- | 0.513 | 0.487 | 0.471 | 0.437 | 0.416 | 0,732 |
| O 64 | O64:K-:H- | 0.492 | 0.463 | 0.432 | 0.407 | 0.385 | 0,857 |
| O 65 | O65:K-:H- | 0.480 | 0.454 | 0.430 | 0.407 | 0.385 | 0,780 |
| O 66 | O66:K-:H25 | 0.514 | 0.480 | 0.442 | 0.412 | 0.393 | 1,292 |
| O 68 | O68:K-:H4 | 0.607 | 0.570 | 0.543 | 0.515 | 0.487 | 0,853 |
| O 69 | O69:K-:H38 | 0.663 | 0.623 | 0.585 | 0.549 | 0.512 | 0,806 |
| O 70 | O70:K-:H42 | 04.62 | 0.428 | 0.396 | 0.368 | 0.342 | 1,062 |
| O 71 | O71:K-:H12 | 0.546 | 0.516 | 0.480 | 0.447 | 0.418 | 1,245 |

| O-Antigen | Referenzstamm (O:K:H-Antigenformel) | Rf-Werte der Hauptbanden | | | | | RU-Wert in kDa |
|-----------|--|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| O 73 | O73:K-:H31 | 0362 | 0.336 | 0.311 | 0.289 | 0.269 | 1,035 |
| O 74 | O74:K-:H39 | 0.537 | 0.514 | 0.493 | 0.470 | 0.450 | 0,682 |
| O 75 | O75:K95:H5 | 0.473 | 0.447 | 0.423 | 0.400 | 0.377 | 0,817 |
| O 76 | O76:K96:H- | 0.624 | 0.592 | 0.562 | 0.535 | 0.509 | 0,930 |
| O 77 | O77:K96:H- | 0.550 | 0.517 | 0.486 | 0.456 | 0.429 | 0,893 |
| O 78 | O78:K-:H- | 0.633 | 0.576 | 0.523 | 0.482 | 0.441 | 1,485 |
| O 79 | O79:K-:H40 | 0.641 | 0.601 | 0.564 | 0.529 | 0.498 | 0,970 |
| O 80 | O80:K-:H26 | 0.756 | 0.704 | 0.658 | 0.614 | 0.537 | 0,895 |
| O 81 | O81:K97:H- | 0.740 | 0.691 | 0.648 | 0.608 | 0.572 | 0,970 |
| O 82 | O82:K-:H- | 0.740 | 0.692 | 0.649 | 0.611 | 0.572 | 0,950 |
| O 83 | O83:K24:H31 | 0.546 | 0.514 | 0.484 | 0.457 | 0.432 | 1,000 |
| O 84 | O84:K-:H21 | 0.703 | 0.630 | 0.597 | 0.565 | 0.538 | 0,885 |
| O 85 | O85:K-:H1 | 0.766 | 0.704 | 0.647 | 0.506 | 0.550 | 1,173 |
| O 86 | O86:K-:H- | 0.712 | 0.656 | 0.605 | 0.559 | 0.516 | 1,855 |
| O 87 | O87:K-:H12 | 0.895 | 0.827 | 0.779 | 0.730 | 0.685 | 1,987 |
| O 88 | O88:K-:H25 | 0.611 | 0.578 | 0.548 | 0.519 | 0.493 | 0,960 |
| O 89 | O89:K-:H16 | 0.502 | 0.473 | 0.445 | 0.419 | 0.397 | 0,847 |
| O 90 | O90:K-:H- | 0.263 | 0.246 | 0.228 | 0.212 | 0.196 | 1,050 |
| O 91 | O91:K-:H- | 0.814 | 0.765 | 0.704 | 0.658 | 0.614 | 0,945 |
| O 92 | O92:K-:H33 | 0.498 | 0.454 | 0.416 | 0.381 | 0.349 | 1,200 |
| O 95 | O95:K+:H33 | 0.594 | 0.576 | 0.561 | 0.545 | 0.529 | 0,290 |
| O 96 | O96:K-:H19 | 0.507 | 0.485 | 0.465 | 0.446 | 0.427 | 0,758 |
| O 97 | O97:K-:H- | 0.450 | 0.412 | 0.377 | 0.343 | 0.308 | 1,442 |
| O 98 | O98:K-:H8 | 0.579 | 0.545 | 0.514 | 0.486 | 0.460 | 0,911 |
| O 99 | O99:K-:H33 | 0.652 | 0.604 | 0.561 | 0.522 | 0.486 | 1,076 |
| O100 | O100:K-:H2 | 0.568 | 0.544 | 0.520 | 0.501 | 0.470 | 0,566 |
| O101 | O101:K-:H33 | 0.437 | 0.415 | 0.395 | 0.374 | 0.358 | 0,707 |
| O102 | O102:K-:H40 | 0.360 | 0.336 | 0.315 | 0.295 | 0.277 | 1,020 |
| O103 | O103:K+:H8 | 0.546 | 0.505 | 0.469 | 0.434 | 0.404 | 1,010 |
| O104 | O104:K-:H12 | 0.639 | 0.606 | 0.575 | 0.546 | 0.519 | 0,806 |
| O105 | O105:K-:H8 | 0.693 | 0.655 | 0.619 | 0.587 | 0.555 | 0,780 |
| O106 | O106:K-:H33 | 0.270 | 0.251 | 0.233 | 0.216 | 0.201 | 1,195 |
| O107 | O107:K98:H27 | 0.536 | 0.507 | 0.476 | 0.448 | 0.422 | 1,079 |
| O108 | O108:K-:H10 | 0.929 | 0.826 | 0.751 | 0.696 | 0.632 | 2,811 |
| O109 | O109:K-:H19 | 0.714 | 0.663 | 0.617 | 0.575 | 0.536 | 0,937 |
| O110 | O110:K-:H39 | 0.619 | 0.591 | 0.564 | 0.538 | 0.514 | 0,993 |

| O-Antigen | Referenzstamm (O:K:H-Antigenformel) | Rf-Werte der Hauptbanden | | | | | RU-Wert in kDa |
|-----------|--|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| O111 | O111:K58:H- | 0.479 | 0.449 | 0.422 | 0.398 | 0.374 | 0,900 |
| O112ac | O112ac:H- | 0.579 | 0.550 | 0.524 | 0.498 | 0.472 | 0,980 |
| O112ab | O112ab:H18 | 0.561 | 0.531 | 0.503 | 0.477 | 0.450 | 0,980 |
| O113 | O113:H221 | 0.613 | 0.579 | 0.548 | 0.517 | 0.490 | 0,710 |
| O114 | O114:H32 | 0.459 | 0.430 | 0.409 | 0.389 | 0.364 | 0,785 |
| O115 | O115:K-:H18 | 0.609 | 0.580 | 0.553 | 0.527 | 0.503 | 1,003 |
| O116 | O116:K+:H10 | 0.559 | 0.527 | 0.497 | 0.468 | 0.444 | 1,088 |
| O117 | O117:K98:H4 | 0.371 | 0.348 | 0.327 | 0.307 | 0.288 | 0,925 |
| O118 | O118:K-:H- | 0.506 | 0.479 | 0.455 | 0.430 | 0.407 | 0,937 |
| O119 | O119:H27 | 0.418 | 0.389 | 0.364 | 0.334 | 0.318 | 1,000 |
| O120 | O120:K18a:H6 | 0.607 | 0.575 | 0.544 | 0.517 | 0.491 | 0,616 |
| O121 | O121:K-:H10 | 0.766 | 0.721 | 0.678 | 0.640 | 0.603 | 1,542 |
| O123 | O123:K-:H16 | 0.553 | 0.509 | 0.470 | 0.434 | 0.403 | 1,419 |
| O124 | O124:H30 | 0.783 | 0.746 | 0.718 | 0.686 | 0.658 | 0,535 |
| O125ab | O125ab:H19 | 0.441 | 0.404 | 0.366 | 0.343 | 0.315 | 1,227 |
| O125ac | O125ac:H6 | 0.426 | 0.397 | 0.358 | 0.329 | 0.303 | 1,165 |
| O126 | O126:K71:H2 | 0.402 | 0.379 | 0.360 | 0.342 | 0.325 | 0,729 |
| O127a | O127a:H- | 0.288 | 0.266 | 0.250 | 0.233 | 0.217 | 1,040 |
| O128ab | O128ab:H2 | 0.364 | 0.342 | 0.323 | 0.306 | 0.290 | 0,747 |
| O129 | O129:K-:H11 | 0.374 | 0.352 | 0.332 | 0.312 | 0.294 | 0,698 |
| O130 | O130:K-:H9 | 0.351 | 0.328 | 0.308 | 0.285 | 0.266 | 0,750 |
| O131 | O131:K-:H26 | 0.613 | 0.589 | 0.565 | 0.543 | 0.522 | 0,667 |
| O132 | O132:K+:H28 | 0.452 | 0.421 | 0.395 | 0.368 | 0.344 | 1,022 |
| O133 | O133:K-:H29 | 0.566 | 0.532 | 0.498 | 0.470 | 0.448 | 1,116 |
| O134 | O134:K-:H35 | 0.350 | 0.330 | 0.311 | 0.295 | 0.278 | 0,897 |
| O135 | O135:K-:H- | 0.594 | 0.553 | 0.517 | 0.484 | 0.453 | 1,215 |
| O136 | O136:K78:H4 | 0.766 | 0.735 | 0.704 | 0.674 | 0.642 | 0,555 |
| O137 | O137:H41 | 0.594 | 0.568 | 0.543 | 0.519 | 0.497 | 0,917 |
| O138 | O138:H14 | 0.765 | 0.732 | 0.701 | 0.674 | 0.642 | 0,552 |
| O139 | O139:K12:H1 | 0.438 | 0.409 | 0.380 | 0.351 | 0.330 | 1,022 |
| O140 | O140:K-:H43 | 0.570 | 0.539 | 0.510 | 0.483 | 0.458 | 1,060 |
| O141ac | O141ac:H4 | 0.589 | 0.564 | 0.539 | 0.516 | 0.494 | 0,899 |
| O142 | O142:H6 | 0.286 | 0.270 | 0.253 | 0.237 | 0.223 | 0,596 |
| O143 | O143:K-:H- | 0.762 | 0.728 | 0.695 | 0.658 | - | 0,600 |
| O144 | O144:K-:H- | 0.739 | 0.704 | 0.671 | 0.638 | 0,604 | 0,692 |
| O145 | O145:K-:H- | 0.373 | 0.362 | 0.332 | 0.312 | 0.294 | 0,748 |

| O-Antigen | Referenzstamm (O:K:H-Antigenformel) | Rf-Werte der Hauptbanden | | | | | RU-Wert in kDa |
|-----------|--|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| O146 | O146:K-:H21 | 0.456 | 0.437 | 0.418 | 0.392 | 0.365 | 0,581 |
| O147 | O147:K88:H19 | 0.520 | 0.500 | 0.488 | 0.471 | 0.447 | 0,691 |
| O148 | O148:K-:H28 | 0.461 | 0.437 | 0.413 | 0.391 | 0.370 | 0,861 |
| O149 | O149:K-:H10 | 0.778 | 0.748 | 0.714 | 0.682 | 0.652 | 1,192 |
| O150 | O150:K93:H6 | 0.655 | 0.612 | 0.573 | 0.537 | - | 1,419 |
| O151 | O151:K-:H10 | 0.437 | 0.412 | 0.389 | 0.367 | 0.347 | 0,852 |
| O152 | O152:K-:H- | 0.662 | 0.632 | 0.603 | 0.567 | 0.551 | 0,646 |
| O153 | O153:K-:H7 | 0.711 | 0.681 | 0.654 | 0.627 | 0.602 | 1,031 |
| O154 | O154:K94:H4 | 0.501 | 0.456 | 0.416 | 0.379 | 0.346 | 1,330 |
| O155 | O155:K-:H9 | 0.671 | 0.646 | 0.621 | 0.593 | 0.573 | 0,630 |
| O156 | O156:K-:H47 | 0.354 | 0.335 | 0.318 | 0.301 | 0.281 | 0,617 |
| O157 | O157:K88:H19 | 0.687 | 0.652 | 0.616 | 0.583 | 0.549 | 0,720 |
| O158 | O158:K-:H23 | 0.791 | 0.761 | 0.729 | 0.698 | 0.669 | 0,533 |
| O159 | O159:K-:H20 | 0.616 | 0.581 | 0.552 | 0.524 | 0.495 | 0,823 |
| O160 | O160:K-:H34 | 0.615 | 0.583 | 0.551 | 0.521 | 0.493 | 0,840 |
| O161 | O161:K-:H20 | 0.645 | 0.610 | 0.577 | 0.545 | 0.514 | 1,000 |
| O162 | O162:K-:H10 | - | 0.538 | 0.515 | 0.491 | 0.469 | 0,823 |
| O163 | O163:K-:H19 | 0.805 | 0.777 | 0.745 | 0.715 | 0.687 | 0,505 |
| O164 | O164:K-:H- | 0.734 | 0.688 | 0.645 | 0.605 | 0.570 | 0,827 |
| O165 | O165:K-:H- | 0.616 | 0.586 | 0.559 | 0.534 | 0.510 | 0,855 |
| O166 | O166:K-:H4 | 0.628 | 0.582 | 0.542 | 0.504 | 0.468 | 1,010 |
| O167 | O167:K-:H5 | 0.612 | 0.580 | 0.552 | 0.525 | 0.500 | 0,917 |
| O168 | O168:K-:H16 | 0.690 | 0.660 | 0.625 | 0.593 | - | 0,700 |
| O169 | O169:K-:H8 | 0.739 | 0.704 | 0.671 | 0.638 | - | 0,624 |
| O170 | O170:K-:H1 | 0.696 | 0.652 | 0.612 | 0.574 | 0.539 | 0,837 |
| O171 | O171:K-:H2 | 0.565 | 0.534 | 0.504 | 0.477 | 0.452 | 1,097 |
| O172 | O172:K-H- | 0.582 | 0.545 | 0.512 | 0.481 | 0.452 | 1,105 |
| O173 | O173:K-:H- | 0.590 | 0.568 | 0.547 | 0.526 | 0.507 | 0,827 |
| O174 | O174:K-:H? | 0.474 | 0.440 | 0.417 | 0.387 | 0.358 | 0,560 |
| O175 | O175:K-H28 | 0.518 | 0.480 | 0.446 | 0.413 | 0.379 | 0,760 |
| O176 | O176:H- | 0.405 | 0.370 | 0.339 | 0.311 | 0.284 | 0,800 |
| O177 | O177:H25 | 0.253 | 0.224 | 0.198 | 0.173 | 0.152 | 1,120 |
| O178 | O178:H7 | 0.520 | 0.486 | 0.454 | 0.422 | 0.393 | 0,690 |
| O179 | O179:H8 | 0.558 | 0.520 | 0.486 | 0.454 | 0.422 | 0,790 |
| O180 | O180:H- | 0.679 | 0.633 | 0.592 | 0.552 | 0.518 | 0,670 |
| O181 | O181:H49 | 0.453 | 0.424 | 0.396 | 0.360 | 0.328 | 0,840 |

Die Ermittlung der Werte für die RU des LPS der Referenzstämme ergab, dass einige O-Typen den gleichen RU-Wert besitzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgeführt. Die Zuordnung des LPS-Musters zum serotypisch definierten O-Antigen wird zusätzlich durch Kombination des RU-Wertes mit dem Vergleich des Gesamtmusters aus der Musterdatei ermöglicht. So konnten Serotypieergebnisse geprüft und bisher nicht beschriebene Serovare eingeordnet werden (siehe Anhang 24 für *E. coli* O174 bzw. Anhang 25-31 für *E. coli* Ont).

Tabelle 14: RU-Werte der *E. coli*-O-Typ-Referenzstämme repräsentativ für mehrere O-Antigene

| RU-Wert in kDa | O-Antigen |
|-----------------------|---------------------|
| 0,71 | 19ab, 32, 113 |
| 0,76 | 5, 41, 175 |
| 0,78 | 65, 105 |
| 0,785 | 39, 114 |
| 0,806 | 69, 104 |
| 0,81 | 15, 50 |
| 0,823 | 159, 162 |
| 0,827 | 164, 173 |
| 0,84 | 48, 160, 181 |
| 0,89 | 34, 36, 56, 58 |
| 0,91 | 13, 37 |
| 0,917 | 137, 167 |
| 0,937 | 109, 118 |
| 0,96 | 51, 88 |
| 0,97 | 79, 81 |
| 0,98 | 112ab, 112ac |
| 1,00 | 62, 83, 119, 161 |
| 1,01 | 6, 11, 22, 102, 166 |
| 1,02 | 132, 139 |
| 1,05 | 4, 55, 90 |
| 1,22 | 18, 23, 25 |
| 1,23 | 7, 10 |
| 1,33 | 40, 154 |
| 1,42 | 123, 150 |

Identische RU-Werte wurden erwartungsgemäß bei Subtypen gleicher Serovare gefunden, z.B. O112ab und O112ac. Beim Serovar O125ab und O125ac hingegen war eine eindeutige Unterscheidung beider Subtypen möglich (RU-Werte 1,227 kDa bzw. 1,165 kDa).

Zur Überprüfung, ob die gefundenen RU-Werte für alle Isolate mit gleichem serologisch ermittelten O-Typ gilt, wurde die Analyse der LPS-Muster von 17 Serovaren mit Isolaten aus Patientenmaterial unterschiedlicher Herkunft und verschiedener Pathovare vorgenommen. Die Ergebnisse zeigten identische Muster für 15 Serovare, aber interessanterweise waren für die Serovare O145 und O157 jedoch 2 bzw. 3 RU-Werte zu bestimmen, die in enger Korrelation mit den Pathovaren EHEC und EPEC bzw. ETEC standen. So konnte für O145 EPEC-Isolate der RU-Wert 0,82 kDa, für EHEC-Isolate dieses Serovars ein RU-Wert von 0,77 kDa (siehe Tabelle 16 und Abbildungen Anhang 21 und Anhang 32) bestimmt werden. Die Darstellung der Ergebnisse für O157 ist ausführlich unter Abschnitt 4.1.6.6. erläutert.

4.1.6.2. Vergleich der LPS-Muster serotypisch kreuzreaktiver O-Antigene

Zur Analyse bekannter Kreuzreaktionen wurden Referenzstämme der entsprechend reagierenden Serovare aufgearbeitet. Für die bekannten Gruppen der Serovare O2, O50, O74, O117 (Gruppe 1), der Serovare O17, O44, O66, O73, O77 (Gruppe 2), der Serovare O19, O86, O90, O127 (Gruppe 3), der Serovare O101, O117, O162 (Gruppe 4) und der Serovare O8, O32, O46, O60 (Gruppe 5) konnten hinsichtlich der LPS-Muster Ähnlichkeiten gefunden werden, jedoch keine Übereinstimmungen. Die RU-Werte der einzelnen LPS innerhalb dieser Gruppen waren nicht identisch.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

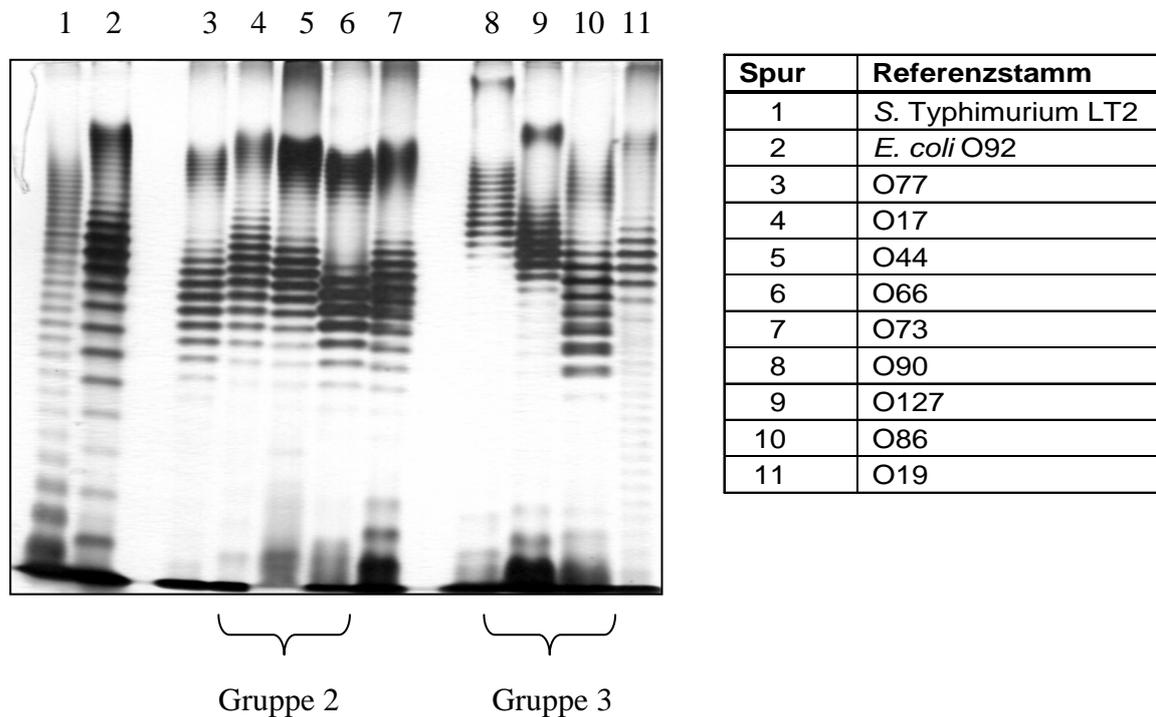
Tabelle 15: Gruppen kreuzreagierender Serovare und deren RU-Werte in kDa

| Gruppe | Serovar | RU-Wert (kDa) |
|---------------|----------------|----------------------|
| 1 | O2 | 1,21 |
| | O50 | 0,81 |
| | O74 | 0,682 |
| | O117 | 0,925 |
| 2 | O17 | 1,11 |
| | O44 | 0,814 |
| | O66 | 1,292 |
| | O73 | 1,035 |
| | O77 | 0,893 |
| 3 | O19 | 0,71 |
| | O86 | 1,855 |
| | O90 | 1,05 |
| | O127 | 1,04 |
| 4 | O101 | 0,707 |
| | O117 | 0,925 |
| | O162 | 0,823 |
| 5 | O8 | 0,684 |
| | O32 | 0,71 |
| | O46 | 0,52 |
| | O60 | 1,09 |

Am Beispiel der Gruppen 2 und 3 ist in Abbildung 11 der direkte Vergleich der einzelnen Serovare dargestellt.

Insbesondere anhand der Gruppe 3 konnte gezeigt werden, dass man die kreuzreagierenden O-Antigene mit Hilfe der elektrophoretischen Eigenschaften der LPS im SDS-PAGE-Gel über das entsprechende charakteristische Muster erfassen kann. Es war so möglich, diese Gruppen in einzelne Serovare aufzulösen, die ansonsten serotypisch nicht oder nur schwer identifizierbar waren (siehe Tabelle 11).

Abbildung 11: Vergleich kreuzreagierender O-Serovare



4.1.6.3. Vergleich der LPS-Muster serotypisch identischer O-Antigene

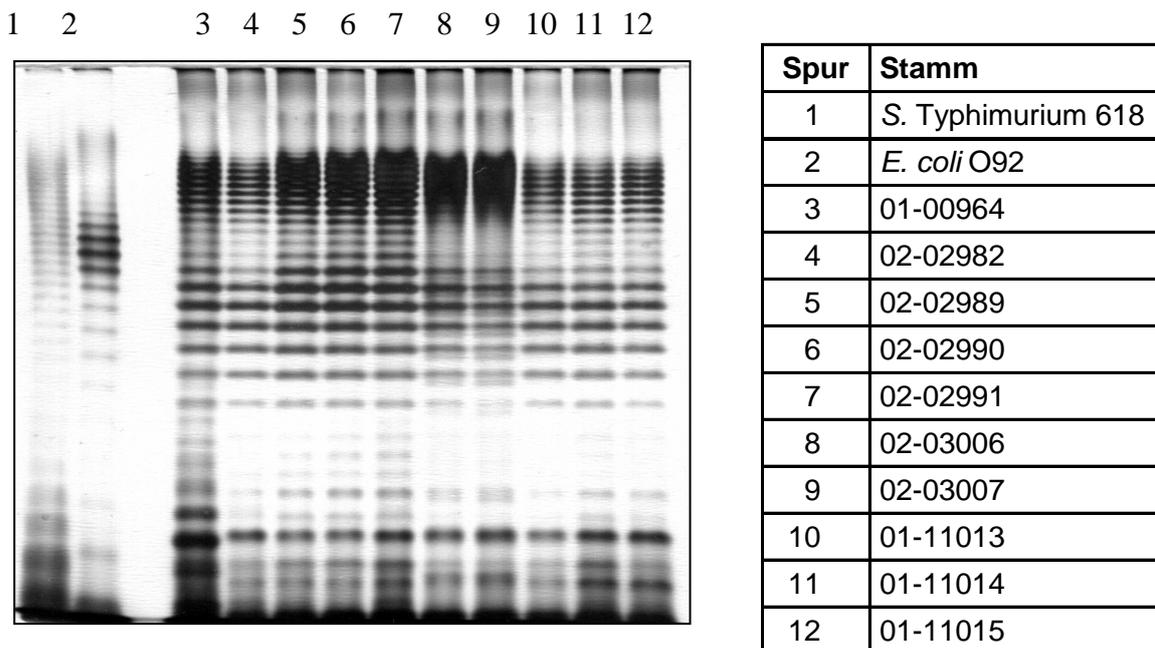
Die Stabilität und Varianz innerhalb von Gruppen identischer Serovare wurde analysiert, indem Isolate der Stammsammlung des NRZ bearbeitet wurden. Insgesamt wurden 222 Stämme aus 21 Serovaren bearbeitet. Bei der Auswahl wurden nach Möglichkeit Isolate unterschiedlicher Quellen (Humanmedizin, Veterinärmedizin und Lebensmittel), Pathovare (EHEC, STEC, EPEC, ExPEC, nicht-pathogene *E. coli*) und Jahrgänge verwendet, um eine möglichst breite Vielfalt prüfen zu können. Die Stammliste ist in Anhang 3 aufgeführt. Ein Beispiel ist für den Serotyp O1 in Abbildung 12 dargestellt. Weitere Abbildungen von LPS-Mustern verschiedener Serotypen sind in Anhang 8-31 angefügt.

Für die Serovare O1, O2, O91, O113, O145 wurden bei einigen Stämmen Doppelbanden gefunden. In Abbildung 12 ist ein solches Beispiel für *E. coli* O1 auf Spur 8 und 9 dargestellt. Diese Doppelbanden waren schwächer ausgeprägt als die Hauptbanden, welche zur Berechnung der RU-Werte herangezogen wurden.

Doppelbanden entstehen z. B. durch unvollständige Glukosylierung des O-Antigens, aber auch durch N- oder O-Acetylderivatisierungen können Strukturvarianten erzeugt werden, die zwar elektrophoretisch, aber nicht serologisch unterschieden werden können (JANN et al., 1995, KNIREL et al., 1994). Eine Reihe von Subtypen in *E. coli*- Serovaren wurde bereits

beschrieben, z. B. O1A, O1B, O1C, O2A, O2B, O18ab, O18ac, O25ab, O25ac, O28ab, O28ac, O45, O45rel., O112 ab, O112ac, O125ab, O125ac, O128ab, O128ac (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984, KNIREL et al., 1994, JANN et al., 1994). Bei den Serovaren O91 und O145 konnte hier erstmals eine solche Beobachtung dokumentiert werden, bei serologisch eindeutiger Identifizierung dieser Stämme. (Anhang 15 und Anhang 21).

Abbildung 12: LPS-Muster von *E. coli* O1-Stämmen



4.1.6.4. Ermittlung von Schwankungsbreiten bei der Erstellung der LPS-Muster

Die Reproduzierbarkeit der LPS-Musteranalyse mittels SDS-PAGE wurde untersucht, indem die Stämme RKI 01-06148 und RKI 01-6439 des *E. coli* Serovars O103:H2 an 5 auf einander folgenden Tagen in jeweils 6 Einzelansätzen (Abimpfung aus 1 Kolonie pro Ansatz) aufgearbeitet und die LPS-Präparationen im beschriebenen Standardverfahren eingesetzt wurden. Es konnten aus den LPS-Mustern die Mittelwerte und die Standardabweichung der RU-Werte für die je 12 Ansätze pro Tag und die jeweiligen Werte für die Tag-zu-Tag Ansätze ermittelt werden (nach KÖHLER et al., 1992):

Inter-Assay (Reproduzierbarkeit innerhalb eines Laufs): RU-Mittelwert: 1,024
Standardabweichung: 0,042%

Intra-Assay (Reproduzierbarkeit des gleichen Präparats): RU-Mittelwert: 1,020
Standardabweichung: 0,019%

4.1.6.5. Ermittlung von experimentell bedingten Schwankungsbreiten für die RU-Werte der *E. coli*-Isolate identischer Serotypen

Aus dem in Abschnitt 4.1.6.3. dargestellten Vergleich der LPS-Muster gleicher Serovare wurde für jeden Serovar die Schwankungsbreite der RU-Werte berechnet und in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Schwankungsbreiten für die RU-Werte (in kDa) bekannter *E. coli*-Serovare

| Serovar | Referenz | Wildtyp | Range Min | Range Max |
|---------|----------|-------------|-------------|-------------|
| O1 | 1,38 | 1,25 | 1,21 | 1,28 |
| O2 | 1,21 | 1,07 | 1,04 | 1,10 |
| O5 | 0,76 | 0,79 | 0,75 | 0,82 |
| O6 | 1,01 | 1,04 | 1,02 | 1,08 |
| O8 | 0,68 | 0,68 | 0,66 | 0,69 |
| O26 | 0,60 | 0,53 | 0,53 | 0,56 |
| O55 | 0,70 | 0,71 | 0,70 | 0,73 |
| O91 | 0,95 | 0,96 | 0,94 | 0,97 |
| O100 | 0,57 | 0,52 | 0,51 | 0,53 |
| O103 | 1,01 | 0,97 | 0,95 | 1,02 |
| O111 | 0,90 | 0,85 | 0,82 | 0,87 |
| O113 | 0,71 | 0,66 | 0,66 | 0,67 |
| O117 | 0,93 | 0,88 | 0,86 | 0,89 |
| O145 | 0,75 | 0,77 / 0,82 | 0,76 / 0,81 | 0,79 / 0,84 |
| O146 | 0,58 | 0,55 | 0,51 | 0,59 |
| O157 | 0,72 | 0,69 / 0,74 | 0,68 / 0,70 | 0,71 / 0,76 |
| O174 | 0,56 | 0,52 | 0,52 | 0,53 |

Aus der Abweichung jeden Einzelwerts vom homologen RU-Mittelwert wurde die Anzahl der Proben ermittelt, welche mit der LPS-Musteranalyse sicher identifiziert werden konnte.

Abbildung 13 stellt diese Abweichungen in kDa grafisch dar.

Die hieraus ermittelte Häufigkeitsverteilung belegte, dass 90% aller Isolate mit einer Differenz von 0,03 kDa dem durch Serotypie ermittelten Serovar zugeordnet werden konnten. Innerhalb der Grenzen von $\pm 0,04$ kDa wurden 95% der Isolate identifiziert (Abbildung 14: 90%-Intervall grün gekennzeichnet, 95%-Intervall rot gekennzeichnet).

Abbildung 13: Darstellung der Abweichung der RU-Werte vom homologen Mittelwert des entsprechenden Serovars (n=222)

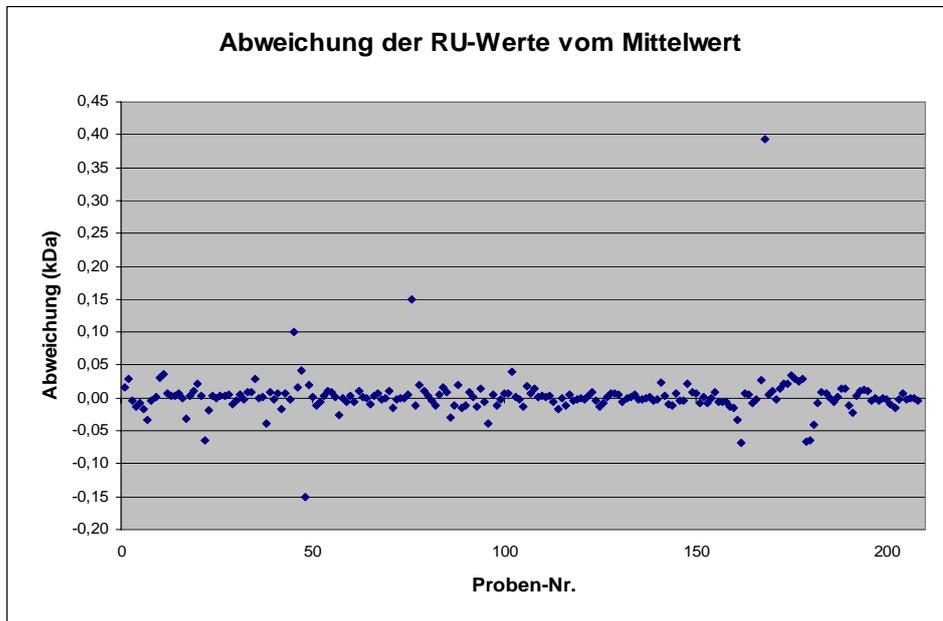
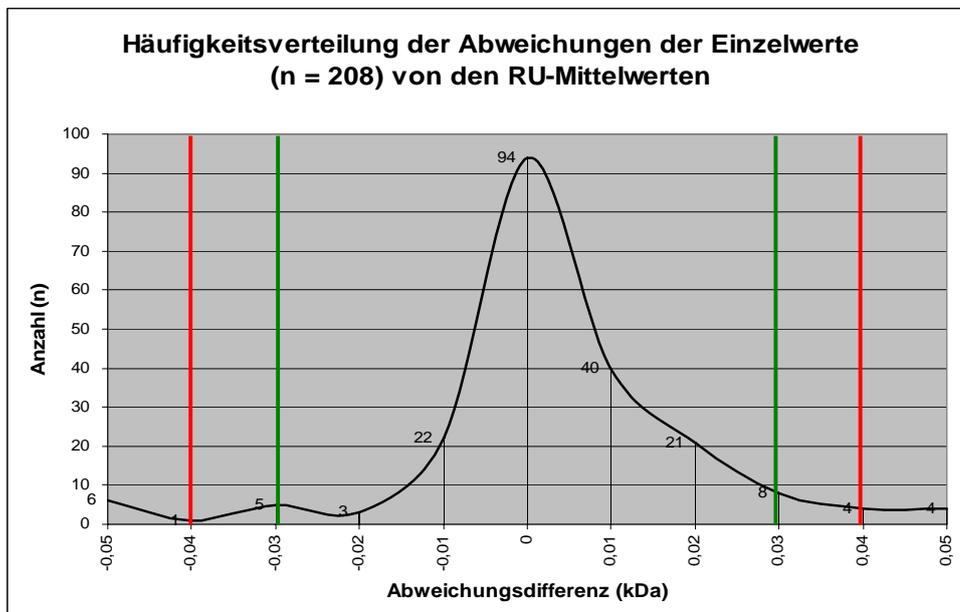


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Abweichungen der Einzelwerte von den RU-Mittelwerten



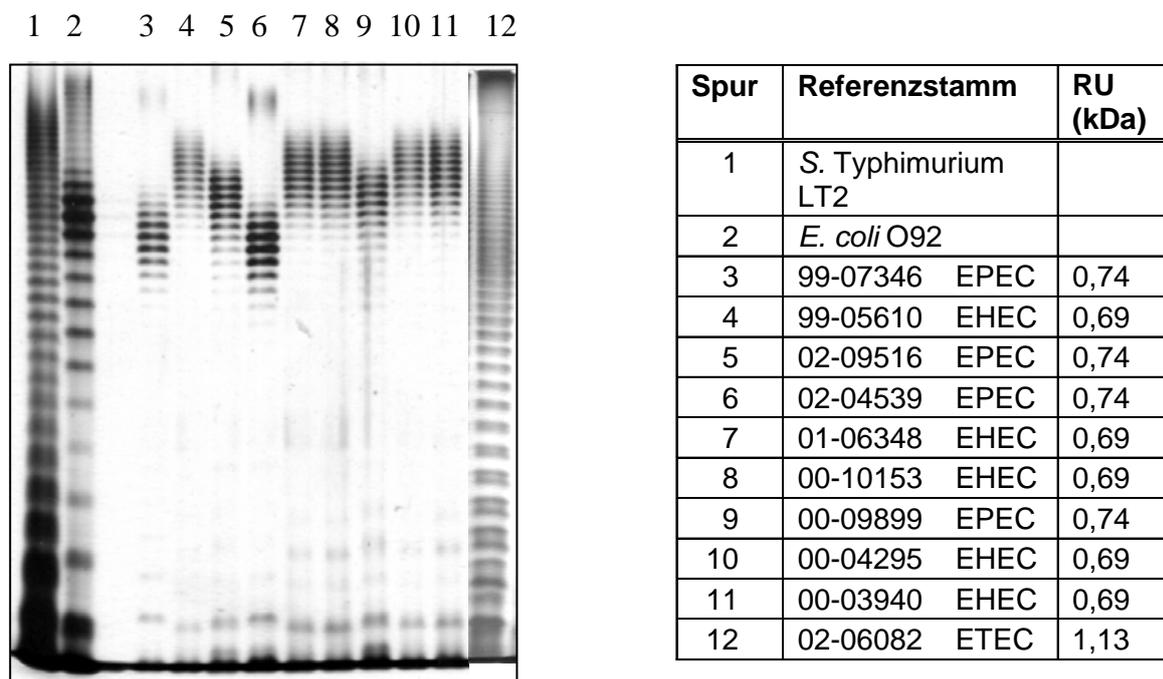
Die außerhalb der Grenzen von $\pm 0,04$ kDa liegenden Einzelisolate (n=8) wurden einer Überprüfung durch die Serotypie unterzogen, die für 5 Fälle von der Primärdiagnostik abweichende Resultate ergab, die sich als Fehlbestimmungen darstellten.

Die Bewertung der LPS-Muster von *E.coli*- Serovaren, die ihrer Virulenzausstattung entsprechend mehreren *E. coli*-Pathovaren zugeordnet werden können, wurde in diesem Zusammenhang näher betrachtet.

4.1.6.6. LPS-Muster des *E.coli* Serovars O157 der Pathovare EHEC, EPEC und ETEC

Der Referenzstamm für die Herstellung von Testserum zur Erfassung von O157 –Antigen ist der Stamm *E. coli* O157:H19 (A2, siehe Anhang 1) des Pathovars ETEC. Für diesen Stamm wurde ein RU-Wert von 0,72 kDa ermittelt. Die untersuchten Isolate des Serovars O157 aus der Stammsammlung des NRZ waren mit diesem Muster nicht identisch, jedoch konnten die RU-Werte der Muster dieser Stämme in den für die Methode ermittelten Grenzen (95%, RU-Mittelwert $\pm 0,04$ kDa) in die Gruppe LPS-157 eingeordnet werden. Bereits SCOTLAND et al. (1992), CHART et al. (1993) und FUJIMOTO et al. (1998) beschrieben unterschiedliche LPS-Muster in der SDS-PAGE bei *E. coli* O157-Isolaten mit verschiedenen Flagellen- (H)-Antigenen. Durch die Auswertung mit RU-Wert-Bestimmung wurde eine Clusterung der Isolate auf Grund des Pathovars, unabhängig von der Kombination mit H-Antigenen beobachtet. Der RU-Wert für EHEC-Isolate (O157:H⁻, O157:H7, SF O157:H⁻) betrug 0,69 kDa, für EPEC-Isolate (O157:H16, O157:H45) 0,74 kDa, für ein ETEC-Isolat (O157:H19) 1,13 kDa. Die repräsentativen LPS-Muster sind in Abbildung 15 gezeigt.

Abbildung 15: LPS-Muster von *E. coli* O157-Isolaten verschiedener Pathovare



4.1.6.7. Überprüfung der Eignung von Alternativmethoden für die Darstellung der LPS-Muster

Die Eignung einer von HITCHCOCK et al., 1983, publizierten Schnellmethode wurde anhand von *E.coli* O91-Stämmen geprüft. Es konnten Bandenmuster erzeugt werden, die aber ungeeignet für eine Musteranalyse waren (Abbildung 16). Die Ausbeute an LPS war zu gering, so dass feine Strukturen, wie Doppelbanden durch Strukturvarianten, nicht sichtbar gemacht wurden. Auch durch Variationen in der verwendeten Auftragsmenge für die SDS-PAGE und eine veränderte Färbetechnik konnten keine Verbesserungen erreicht werden. Diese Schnellmethode sollte einen zeitlichen Vorteil bei der Präparation der LPS darstellen, jedoch wurde dieser an sich positive Effekt durch die Qualität der Gele aufgehoben. Die Anwendbarkeit ist daher begrenzt. Die Aufarbeitung des gleichen Stammes nach der Standardmethode (WESTPHAL und JANN, 1965) verlängert die Analysezeit um 2 Tage (Abbildung 17). Für die Auswertung und Determination schwer identifizierbarer Isolate oder die Beschreibung neuer Serovaren muß sie ausschließlich eingesetzt werden. Allerdings lässt die Methode nach HITCHCOCK eine grobe Einschätzung zu, dass für Analysen innerhalb kurzer Zeiträume (z.B. Ausbruchsuntersuchungen) kurzfristig eine Orientierung ermöglicht wird.

Abbildung 16: LPS-Präparation von *E.coli* O91- Isolaten durch Schnellaufschluß nach HITCHCOCK et al. (1983)

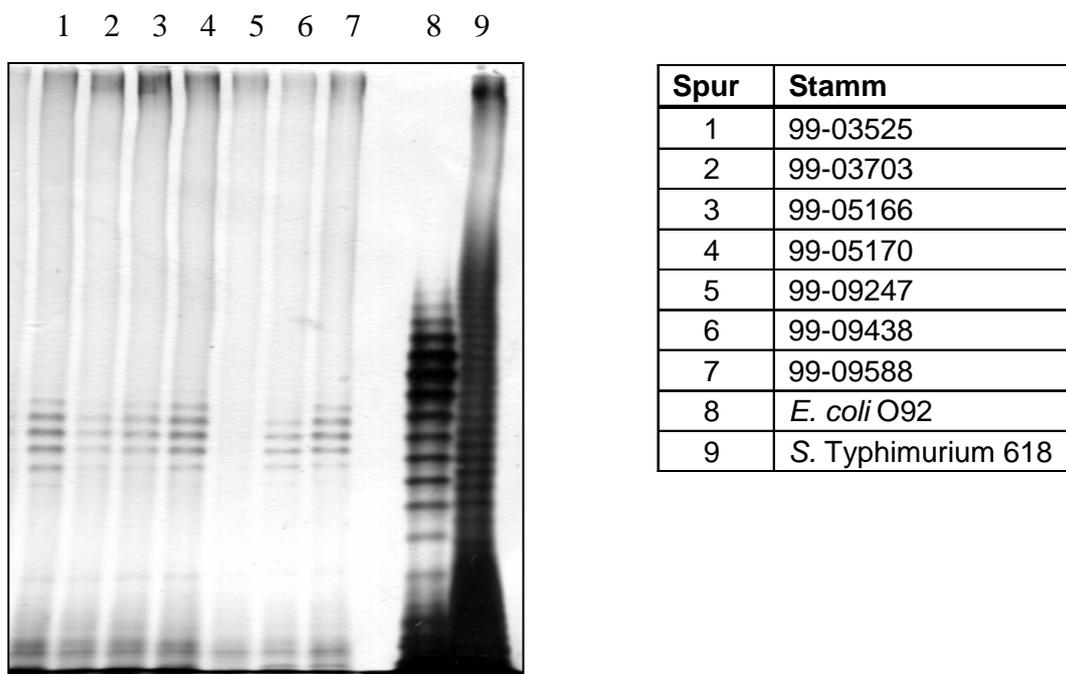
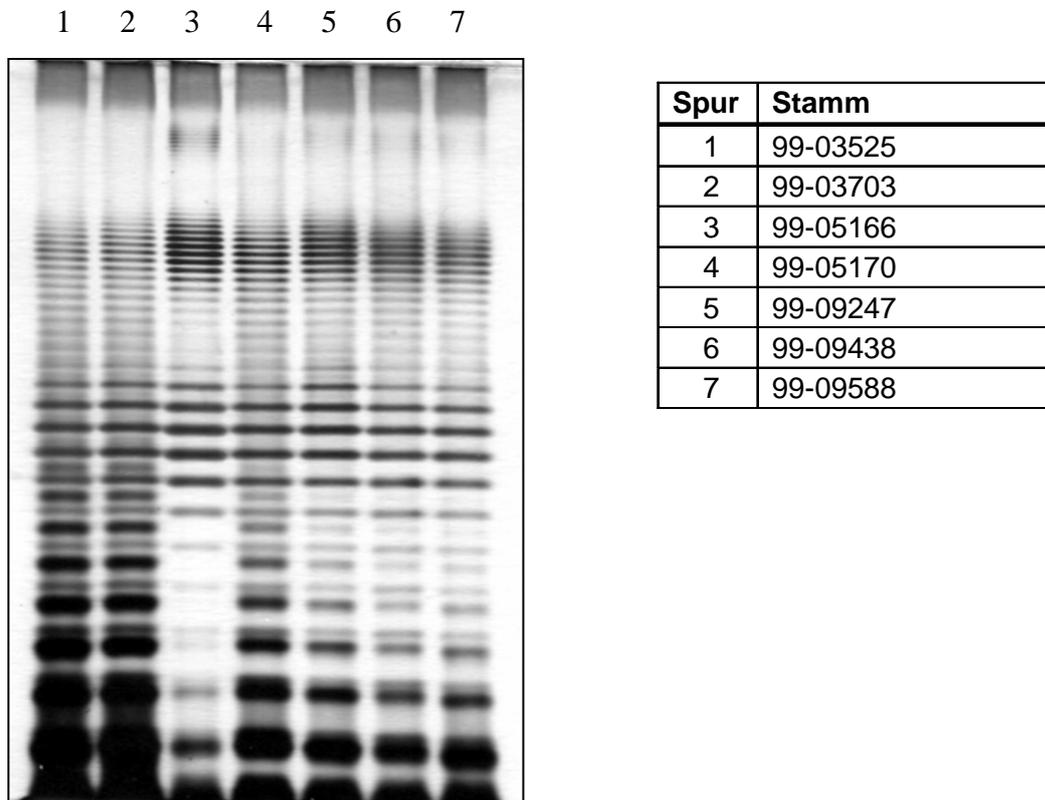


Abbildung 17: LPS-Präparation von *E.coli* O91- Isolaten durch Phenol-Wasser-Extraktionsmethode nach WESTPHAL und JANN (1965)



4.1.6.8. LPS-Muster von nicht typisierbaren Serotypen (Ont)

251 *E.coli*-Isolate aus der Stammsammlung des NRZ, welche nicht mit der Testpalette der Testseren für die O-Antigene von O1- O181 serologisch determiniert werden konnten, und damit serotypisch als Ont (= nicht typisierbar) bezeichnet werden müssen, wurden mittels LPS-Musteranalyse untersucht. Diese O-Antigene können entweder durch Fehlbesimmungen (Unsicherheit der Agglutination) zustande gekommen sein, oder sie stellen neue, bisher nicht bekannte O-Typen dar.

Die entsprechenden *E. coli*-Isolate waren mehreren Pathovaren und unterschiedlichen Quellen zugeordnet. Aus einer Gruppe von Stämmen mit epidemiologischem Zusammenhang, wie z.B. von Ausbruchsgeschehen, wurde je nur 1 Stamm ausgewählt. Die erarbeiteten LPS-Muster wurden in einer Musterdatei zusammengefasst und in Dendrogrammen ausgewertet (Daten nicht aufgeführt). Cluster von Stämmen mit ähnlichem Muster wurden weiter bearbeitet. Die erstellten Muster wurden mit der Referenzmuster-Datei verglichen. Identische

oder nahezu identische LPS-Muster dienten als Grundlage für einen erneuten Vergleich mittels Serotypie, sowie zur Ermittlung der RU-Werte und der Herstellung von Testserum. Es konnten die in Tabelle 17 aufgeführten neuen, bisher nicht beschriebenen Serovare serologisch charakterisiert und ihre RU-Werte berechnet werden (Tabelle 18).

Bis zur endgültigen Neueinstufung als definitive *E. coli*-Serovare durch die WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, werden diese Serovare als OX 187 bis OX 192 bezeichnet (*E. coli*-Stämme mit den Antigenen OX182 bis OX186 sind dort bereits in Bearbeitung zur Definition als eigenständige Serovare.).

Bis auf den Serovar OX190:H11 gehörten alle neuen Serovare aus dem Pathovar „EHEC“ an. Die bearbeiteten Isolate des Serovars OX190:H11 wurde ebenfalls aus Stuhl von Diarrhoe-Patienten isoliert. Die Stämme sind dadurch charakterisiert, dass sie mit Testseren für Salmonella-O30-Antigen reagieren. Die Antigenverwandtschaft bedingt jedoch keine Ähnlichkeit im LPS-Muster (Anhang 28).

Tabelle 17: Neue Serovare

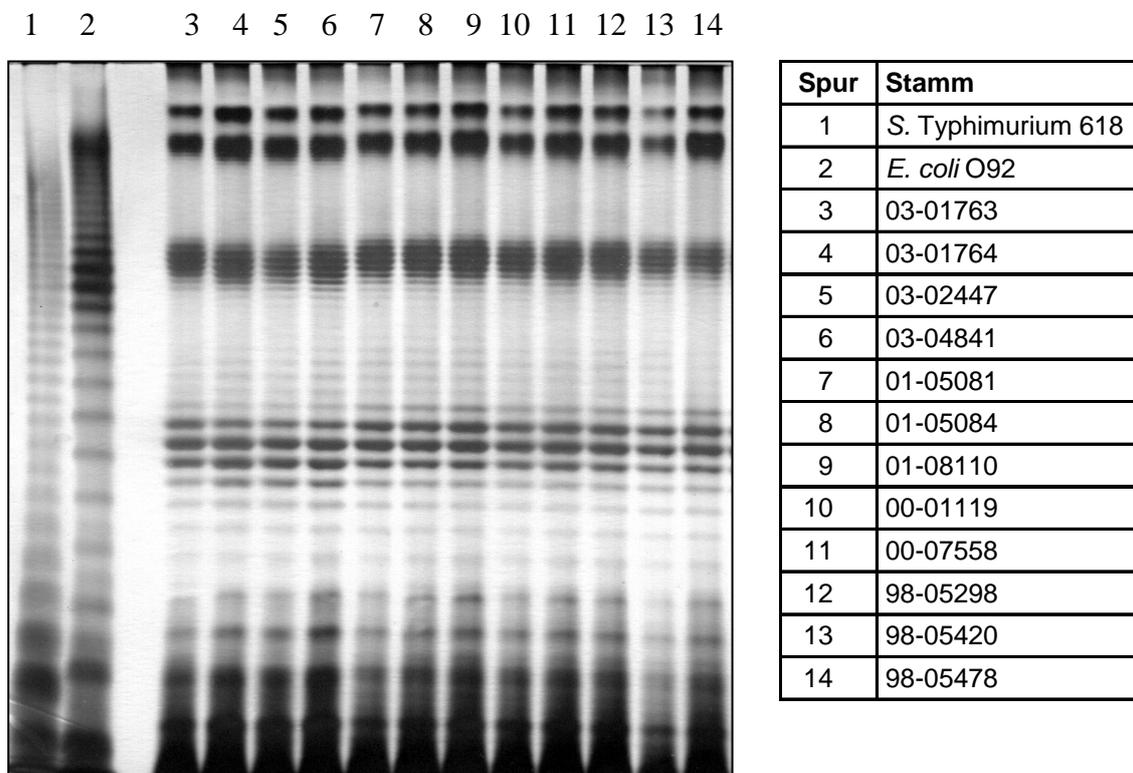
| Serovar | Referenzstamm | Nominierte Bezeichnung |
|---------|---------------|------------------------|
| Ont:H18 | 02-05342 | OX187:H18 |
| Ont::H2 | 01-02914 | OX188:H2 |
| Ont:H8 | 00-01128 | OX189:H8 |
| Ont:H11 | 01-09679 | OX190:H11 |
| Ont:H19 | 01-03482 | OX191:H19 |
| Ont:H28 | 99-06301 | OX192:H28 |

Tabelle 18: RU-Werte (in kDa) der neuen *E. coli* Ont-Serovare

| Serovar | RU-Wert | Range Min | Range Max |
|-----------|---------|-----------|-----------|
| OX187:H2 | 0,55 | 0,54 | 0,55 |
| OX188:H8 | 0,57 | 0,53 | 0,60 |
| OX189:H11 | 0,86 | 0,83 | 0,87 |
| OX190:H18 | 0,58 | 0,57 | 0,60 |
| OX191:H19 | 0,69 | 0,68 | 0,70 |
| OX192:H28 | 0,61 | 0,61 | 0,62 |

In Abbildung 18 und Tabelle 19 sind die charakteristischen Eigenschaften für den Serovar OX187:H18 dargestellt. Die Einzelisolate (n=15) waren (bis auf eine Probe aus Rinderkot) humanen Ursprungs. Sie wurden aus dem Stuhl von symptomlosen Ausscheidern, sowie Patienten mit blutiger Diarrhoe isoliert. Das Alter der Patienten variierte von 0 bis 52 Jahren, wobei 47 % unter 7 Jahre alt waren. In einem Fall wurde nach 2 Monaten im Rahmen einer Verlaufskontrolle derselbe Stamm erneut isoliert.

Abbildung 18: LPS-Muster von *E. coli* OX187:H18-Stämmen und Charakterisierung der Virulenzeigenschaften



Virulenzeigenschaften: *stx1*-positiv 75%, *stx2*-positiv 100%, *eaeA*- positiv 0%,
ehxA-positiv 100%, *astA*-positiv 0%, *catP*-positiv 0%

Tabelle 19: Biochemische Charakterisierung nach FARMER für die Isolate des Serovars
E. coli OX187:H18

| Eigenschaften | Reaktion (Anteil der Isolate in %) |
|------------------------------|---|
| D-Glucose, Gas | + (100) |
| Säurebildung aus: D-Adonitol | - (100) |
| Ducitol | + (100) |
| Sorbitol | + (100) |
| Raffinose | + (100) |
| Arabinose | + (100) |
| Xylose | + (100) |
| Rhamnose | + (62,5) |
| Maltose | + (100) |
| Salicin | - (100) |
| i-Inositol | - (100) |
| Lactose | + (100) |
| Sucrose | + (100) |
| D-Mannitol | + (100) |
| D-Glucose | + (100) |
| Melibiose | + (100) |
| Mucate | + (100) |
| Indol | + (100) |
| KCN | - (100) |
| H ₂ S | - (100) |
| Gelatine | - (100) |
| Simmons' Citrat | - (100) |
| KNO ₃ | + (100) |
| Voges Proskauer | - (100) |
| Methylrot | + (100) |
| Urease | - (100) |
| Malonat | - (100) |
| Lysin-Decarboxylase | + (62,5) |
| Arginin-Decarboxylase | - (100) |
| Ornithin-Decarboxylase | - (100) |

4.2. H-Antigene

4.2.1. Ausbildung der H-Antigene

Für den sicheren Nachweis der H-Antigene ist die Ausbildung der Flagellen von *E. coli* in optimalen Nährmedien und bei optimalen Bebrütungstemperaturen eine wichtige Voraussetzung.

Eine Inkubation der Stämme bei 30°C wurde auf Grund der Erkenntnisse zur Flagellenexpression bei anderen gram-negativen Spezies (z.B. *Yersinia*, *Salmonella*) allgemein bevorzugt. Die Verwendung von Schwärmagar in Petrischalen (wie bei der Testung von Flagellen-Antigen bei Salmonellen) und die Inokulation von verschiedenen Agarmedien (Nähragar, Glucose-haltige Medien) in Reagenzgläsern wurde als hinreichend geeignet bewertet (ØRSKOV et al., 1987, ØRSKOV und ØRSKOV, 1992).

4.2.1.1. Schwärmverhalten von *E. coli* bei Variation der Temperaturbedingungen

Die Erfassung des Schwärmverhaltens und die Prüfung der Möglichkeiten zur Präparation von H-Antigen-Bouillon für den optimalen Nachweis von H-Antigenen mittels Serotypie erfolgte durch Kultivierung von 37 *E. coli*- Isolate aus der Stammsammlung des NRZ bei 30°C und 37°C (siehe Tabelle 20).

Hierzu wurden Einzelkolonien dieser Isolate von Enterohämolytinagar auf Beweglichkeitsagar in U-Röhrchen inokuliert. Die Beweglichkeit konnte als Swarming distance (SD) in mm pro Tag (d) beschrieben werden. Die ausgewählten Isolate bildeten Flagellen, welche serotypisch eindeutig definiert waren. Die gemessenen SD-Werte der Stämme bei 30°C und 37°C zeigten für 5 Stämme einen geringfügig kleineren SD-Wert bei 30°C (siehe Tabelle 20), woraus ersichtlich ist, dass die Inkubation unter beiden Temperaturbedingungen möglich ist. Aus ökonomischen Gründen wurde im Weiteren als Inkubationstemperatur 37°C ausgewählt.

Tabelle 20: Ermittlung der Swarming distance (SD) in mm pro Tag für *E. coli*- Isolate aus Einsendungen an das NRZ bei Inkubation mit 30°C bzw. 37°C

| RKI-Nr. | Serovar | Pathovar | H-Ag-Titer | SD 37°C in mm/d | SD 30°C in mm/d |
|----------|-----------------|----------|------------|-----------------|-----------------|
| 01-10227 | O26:H11 | EHEC | 10 | 125/4 | 125/4 |
| 01-10455 | O26:H11 | EHEC | 10 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11089 | O26:H11 | EHEC | 10 | 125/7 | 125/9 |
| 01-11458 | O26:H11 | EHEC | 10 | 125/3 | 125/4 |
| 01-11898 | O26:H11 | EHEC | 10 | 125/3 | 125/3 |
| 01-01934 | O91:H14 | EHEC | 7 | 125/1 | 125/1 |
| 01-04259 | O91:H14 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/2 |
| 01-05562 | O91:H14 | EHEC | 10 | 125/1 | 125/1 |
| 01-06400 | O91:H14 | EHEC | 7 | 125/5 | 125/5 |
| 02-03044 | O103:H2 | EHEC | 7 | 125/1 | 125/1 |
| 02-03624 | O103:H2 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 02-03702 | O103:H2 | EPEC | 7 | 125/1 | 125/1 |
| 02-03709 | O103:H2 | EHEC | 6 | 125/1 | 125/1 |
| 02-03802 | O103:H2 | EHEC | 7 | 125/1 | 125/1 |
| 02-03803 | O103:H2 | EHEC | 7 | 125/1 | 125/1 |
| 01-00496 | O113:H4 | EHEC | 10 | 125/5 | 125/7 |
| 01-00498 | O113:H4 | EHEC | 6 | 125/7 | 125/7 |
| 01-01006 | O113:H4 | EHEC | 9 | 125/1 | 125/1 |
| 01-01901 | O113:H4 | EHEC | 10 | 125/1 | 125/1 |
| 01-01902 | O113:H4 | EHEC | 10 | 125/1 | 125/1 |
| 01-01903 | O113:H4 | EHEC | 10 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11948 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11949 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11950 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11952 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11953 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11955 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11960 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 01-11962 | O117:H7 | EHEC | 8 | 125/1 | 125/1 |
| 02-02109 | O146:H21 | EHEC | 8 | 125/2 | 125/2 |
| 02-02123 | O146:H21 | EHEC | 8 | 125/3 | 125/4 |
| 02-02140 | O146:H28 | EHEC | 10 | 125/2 | 125/2 |

| RKI-Nr. | Serovar | Pathovar | H-Ag-Titer | SD 37°C in mm/d | SD 30°C in mm/d |
|----------|-----------------|----------|------------|-----------------|-----------------|
| 02-02177 | O146:H21 | EHEC | 6 | 125/1 | 125/1 |
| 02-02793 | O146:H21 | EHEC | 9 | 125/1 | 125/1 |
| 00-09899 | O157:H45 | EPEC | 10 | 125/1 | 125/1 |
| 01-06348 | O157:H16 | EPEC | 10 | 125/1 | 125/1 |
| 02-09516 | O157:H45 | EPEC | 6 | 125/1 | 125/1 |

4.2.1.2. Schwärmverhalten unter anaeroben Inkubationsbedingungen

Die Testung einer Auswahl von 28 Isolaten aus der Sammlung des NRZ der *E. coli*-Pathovaren EHEC, EPEC und EIEC ergab für 12 Isolate eine größere Beweglichkeit unter anaeroben Bedingungen (siehe Tabelle 21). Aus dieser Gruppe wurde in einem Fall ein H-Antigen nachgewiesen (H7). In 3 Fällen konnte unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen ein H-Antigen ermittelt werden (H11, H14, H16). In einem Fall wurde ein H-Antigen ausschließlich nach aerober Inkubation typisiert (H8). Es konnte in dieser Inkubationsvariation kein Kriterium gefunden werden, welches für die Beschreibung einer SOP entscheidend gewesen wäre. Vielmehr stellte auch diese Variante eine Möglichkeit dar, unter bestimmten Problemstellungen (wie Ausbruchsuntersuchungen) geeignetes Material präparieren zu können.

Tabelle 21: Ermittlung der Swarming distance (SD) in mm nach 7 Tagen für *E. coli*-Isolate aus Einsendungen des NRZ bei aeroben und anaeroben Inkubationsbedingungen bei 37°C

| RKI-Nr. | Pathovar | Serovar | U-Rohr aerob SD in mm/7d | U-Rohr anaerob SD in mm/7d | H-Antigen |
|----------|----------|---------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|
| 04-01072 | EHEC | O111:H ⁻ | 125 | 65 | H8 |
| 04-00158 | EHEC | O111:H ⁻ | 30 | 65 | n.d. |
| 04-01773 | EHEC | O115:H ⁻ | 30 | 45 | n.d. |
| 04-02064 | EHEC | O118:H ⁻ | 125 | 125 | H16 |
| 04-02068 | EHEC | O128:H ⁻ | 30 | 30 | n.d. |
| 04-01959 | EHEC | O128:H ⁻ | 30 | 45 | n.d. |
| 02-02117 | EHEC | O145:H ⁻ | 10 | 45 | n.d. |

| RKI-Nr. | Pathovar | Serovar | U-Rohr aerob SD in mm/7d | U-Rohr anaerob SD in mm/7d | H-Antigen |
|----------|----------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|
| 04-02246 | EHEC | O146:H ⁻ | 30 | 30 | n.d. |
| 04-01992 | EHEC | NSFO157:H ⁻ | 30 | 45 | n.d. |
| 03-04847 | EHEC | SFO157:H ⁻ | 10 | 125 | H7* |
| 04-02496 | EHEC | O26:H ⁻ | 10 | 45 | n.d. |
| 04-01862 | EPEC | O26:H ⁻ | 30 | 65 | n.d. |
| 04-00598 | EHEC | O26:H ⁻ | 125 | 125 | H11 |
| 04-01330 | EHEC | O5:H ⁻ | 30 | 30 | n.d. |
| 04-01664 | EHEC | O76:H ⁻ | 10 | 30 | n.d. |
| 04-01019 | EHEC | O76:H ⁻ | 10 | 30 | n.d. |
| 04-01070 | EHEC | O78:H ⁻ | 30 | 30 | n.d. |
| 04-00104 | EHEC | O78:H ⁻ | 10 | 65 | n.d. |
| 04-02420 | EHEC | O91:H ⁻ | 65 | 45 | n.d. |
| 04-01819 | EHEC | O91:H ⁻ | 125 | 125 | H14 |
| 04-01684 | EHEC | O91:H ⁻ | 10 | 65 | n.d. |
| 02-10479 | EIEC | O124:H ⁻ | 10 | 10 | n.d. |
| 98-10281 | EIEC | O144:H ⁻ | 10 | 10 | n.d. |
| 00-04745 | EIEC | O164:H ⁻ | 10 | 10 | n.d. |
| 04-05739 | EHEC | O145:H ⁻ | 30 | 30 | n.d. |
| 04-05510 | EHEC | NSFO157:H ⁻ | 10 | 10 | n.d. |
| 04-05552 | EHEC | NSFO157:H ⁻ | 30 | 30 | n.d. |
| 04-05605 | EPEC | O142:H ⁻ | 10 | 10 | n.d. |

* Agglutinations mittels Wellcolex[®] H7-Latex-Test

4.2.2. Serologische Charakterisierung

Die Untersuchung von Stämmen, welche serologisch nicht oder nicht eindeutig bestimmbar waren (H⁻ oder Hnt), war insbesondere für die Erarbeitung von Bewertungskriterien für die Auswertung der Serotypie-Ergebnisse (Agglutinationsreaktion) von Bedeutung.

Neben den bereits erwähnten Variationen zur Temperatur (Abschnitt 4.2.1.1.) und der Sauerstoffversorgung (Abschnitt 4.2.1.2.) wurde an dieser Stelle die Stabilität der Isolate

geprüft, indem mehrere Einzelkolonien von Kulturen auf Enterohämolysinagar in jeweils separate U-Röhrchen überimpft und bis zu 10 Tage bei 37°C inkubiert wurden. Die verwendeten Stämme aus der Stammsammlung des NRZ gehörten den Serovaren O26 und O55 an (Pathovar EHEC, EPEC). Bei 8 von den in Tabelle 22 aufgeführten 12 Isolaten konnten H-Antigen-Bouillon von mindestens einem U-Röhrchen präpariert werden, die zur Serotypie eingesetzt wurden. Die Daten in Tabelle 22 zeigen, dass die *E. coli*-Population hinsichtlich der Ausbildung der Flagellen sehr heterogen sein kann und daher H⁻ oder Hnt-Variationen stets die wiederholte Untersuchung verschiedener Kolonien erfordern.

Tabelle 22: Serotypische Überprüfung von nicht-motilen *E. coli*-Stämmen durch Prüfung mehrerer Einzelkolonien

| RKI-Nr. | Serovar/ Pathovar | Kolonien | SD in mm/d | H-Antigen* |
|----------|----------------------|----------|------------|------------|
| | | | | |
| 02-05313 | O26:H ⁻ | 1.EK | 10 / 7 | |
| | EPEC | 2.EK | 25 / 7 | |
| | | 3.EK | 25 / 7 | |
| | | 4.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 5.EK | 65 / 7 | |
| | | 6.EK | 125/ 3 | H11 |
| | | 7.EK | 125/ 2 | H11 |
| 03-02915 | O55:H ⁻ | 1.EK | 10 / 7 | |
| | EPEC | 2.EK | 10 / 7 | |
| | | 3.EK | 10 / 7 | |
| | | 4.EK | 10 / 7 | |
| | | 5.EK | 125/ 3 | H10 |
| | | 6.EK | 25 / 7 | |
| | | 7.EK | 25 / 7 | |
| 02-02416 | O26:H ⁻ | 1.EK | 125/ 3 | H11 |
| | EHEC | 2.EK | 125/ 4 | H11 |
| | | 3.EK | 125/ 4 | H11 |
| | | 4.EK | 125/ 4 | H11 |
| | | 5.EK | 25 / 7 | |
| | | 6.EK | 25 / 7 | |
| | | 7.EK | 10 / 7 | |
| 02-05967 | O26:H ⁻ | 1.EK | 125/ 2 | H11 |
| | EHEC | 2.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 3.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 4.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 5.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 6.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 7.EK | 25 / 7 | |
| 02-05054 | O26:H ⁻ | 1.EK | 10 / 7 | |
| | EHEC | 2.EK | 10 / 7 | |

| RKI-Nr. | Serovar/ Pathovar | Kolonien | SD in mm/d | H-Antigen* |
|----------|----------------------|----------|------------|------------|
| | | | | |
| | | 3.EK | 10 / 7 | |
| | | 4.EK | 10 / 7 | |
| | | 5.EK | 10 / 7 | |
| | | 6.EK | 10 / 7 | |
| | | 7.EK | 125/ 3 | H11 |
| 02-05051 | O26:H ⁻ | 1.EK | 125/ 2 | H11 |
| | EHEC | 2.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 3.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 4.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 5.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 6.EK | 25 / 7 | |
| | | 7.EK | 25 / 7 | |
| 02-03133 | O26:H ⁻ | 1.EK | 125/ 3 | H11 |
| | EHEC | 2.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 3.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 4.EK | 125/ 2 | H11 |
| | | 5.EK | 125/ 4 | H11 |
| | | 6.EK | 25 / 7 | |
| | | 7.EK | 25 / 7 | |
| 02-07577 | O26:H ⁻ | 1.EK | 125/ 3 | H11 |
| | EHEC | 2.EK | 125/ 3 | H11 |
| | | 3.EK | 125/ 3 | H11 |
| | | 4.EK | 65 / 7 | |
| | | 5.EK | 65 / 7 | |
| | | 6.EK | 25 / 7 | |
| | | 7.EK | 25 / 7 | |
| 02-06726 | O26:H ⁻ | 1.-7.EK | 10 / 10 | |
| | EHEC | | | |
| 02-05057 | O26:H ⁻ | 1.-7.EK | 10 / 10 | |
| | EHEC | | | |
| 02-05047 | O26:H ⁻ | 1.-7.EK | 10 / 10 | |
| | EHEC | | | |
| 02-07405 | O26:H ⁻ | 1.-7.EK | 10 / 10 | |
| | EHEC | | | |

* serologischer Nachweis des H-Antigens durch Agglutinationsreaktion

4.2.3. Herstellung der Testseren

Es liegen alle Testseren für die *E.coli*-H-Antigene 1-56 aus Eigenherstellung vor (siehe Abschnitt 3: Material und Methoden). Kommerziell erhältliche Testseren für H-Antigene (z.B. SSI Kopenhagen, DK, und DENKA SEIKEN, JPN) wurden nicht verwendet.

Für H-Antigen 7 wurde für Vergleichszwecke der Wellcolex ® H7-Latex-Test der Fa. OXOID, GB, angewandt (siehe auch Tabelle 21).

4.2.4. Charakterisierung der Kreuzreaktivität

Für die Isolate aus der Stammsammlung des NRZ und die Referenzstämme für *E. coli* H-Antigene der Referenzstammsammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* Kopenhagen, DK, wurden die Kreuzreaktionen aus der serotypischen Testung dokumentiert. Es wurde eine zusätzliche Reaktion außer den bereits bei ØRSKOV und ØRSKOV (1984) publizierten Kreuzreaktionsmöglichkeiten beim Nachweis von H-Antigenen beobachtet. Das H-Antigen 7 wurde bei nahezu allen *E. coli* O157:H7 mit dem Testserum für H7 und ebenso mit dem Testserum für H9 erfaßt. Weitere Serovare mit diesem Effekt waren O104:H7 und O15:H7. Bei den homologen Referenzstämmen U5-41 für H7 und Bi7509-41 (siehe Anhang 1) für H9 wurden keine Kreuzreaktionen erfaßt. Ebenso konnten die Serovare O1:H7, O2:H7 und O55:H7 eindeutig bestimmt werden.

Eine Überprüfung dieser Reaktion erfolgte mittels *fliC*-RFLP (siehe Abschnitt 4.2.5.).

Die am häufigsten gefundenen kreuzreagierenden H-Antigene waren die Formen H11/H21 und H4/H17 (assoziiert mit O26 bzw. O113). Sie konnten mit Hilfe von absorbierten Testseren eindeutig bestimmt werden.

Der Nachweis der von RATINER (1999) publizierten Phasenvariationen von H4 und H17, sowie H3 und H16 gelang bei keinem Isolat aus der Stammsammlung des NRZ.

4.2.5. Molekulare Charakterisierung

Die Beschreibung der Typisierungsmöglichkeit der *E. coli*-Serovare anhand des *fliC*-Polymorphismus durch FIELDS et al. (1997) und MACHADO et al. (2000) diente als Grundlage für eine Darstellung der Vergleichbarkeit von Serotypie und *fliC*-PCR-RFLP.

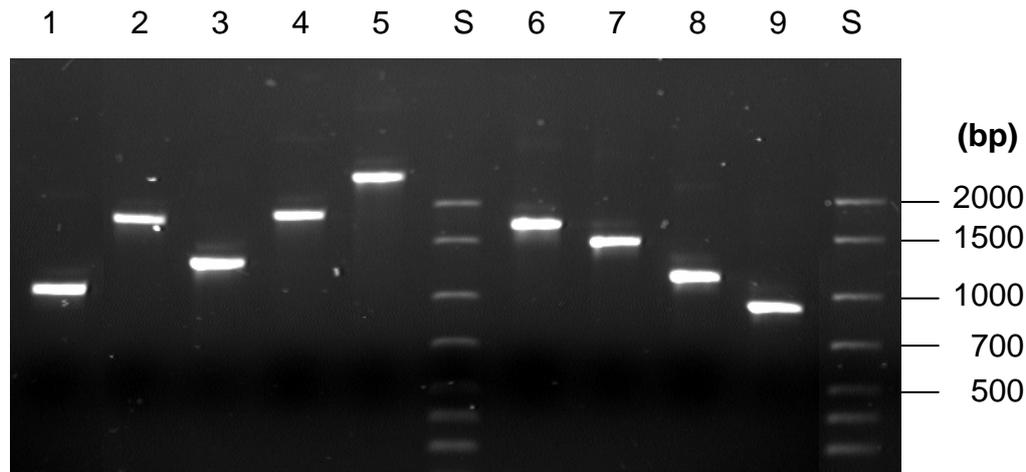
4.2.5.1. PCR des *fliC*-Gens von *E. coli*-Referenzstämmen

Durch die Bearbeitung der *E. coli*-H-Typ-Referenzstämme (H1 bis H56), sowie verschiedener *E. coli*-O-Typ-Referenzstämme mit charakteristischen H-Antigenen, der Stammsammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, konnte eine Musterdatei erstellt werden, auf deren Basis die Wildtypstämme aus der Stammsammlung des NRZ erfaßt und analysiert werden konnten (Abbildung 19).

Mehr als 220 *E. coli*-Stämme wurden sowohl nach FIELDS et al. (1997) als auch nach MACHADO et al. (2000) bearbeitet und miteinander verglichen. Alle getesteten Stämme

lieferten PCR- Produkte verschiedener Größen in einem Spektrum von 0,8 bis 2,2 kbp, wie beispielhaft an einigen Stämmen in Abbildung 19 dargestellt. Auch serotypisch als Hnt (= nicht typisierbar) eingeordnete Stämme konnten identifiziert werden.

Abbildung 19: PCR-Produkte einiger serotypisch definierter H-Antigene von *E. coli*
(nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)



| Spur | <i>E. coli</i> | Methode |
|------|-------------------|---------|
| 1 | O7:H4 | fliC-F |
| 2 | O15:H9 | fliC-F |
| 3 | O92:H33 | fliC-F |
| 4 | O8:H19 | fliC-F |
| 5 | O164:H | fliC-F |
| 6 | O157:H12 | fliC-M |
| 7 | O118:H16 | fliC-M |
| 8 | O111:H2 | fliC-M |
| 9 | O7:H4 | fliC-M |
| S | Molekularstandard | |

Allerdings konnten für die Stämme mit den H-Antigenen 4, 17, 47, 48, 53 und 54 nach der FIELDS-Methode und bei H-Antigen 48 für die MACHADO-Methode kein PCR-Produkt erhalten werden. Alle erhaltenen PCR-Produkte ließen sich mit den Restriktionsenzymen *RsaI* bzw. *CfoI* schneiden und es wurden die in Tabelle 23 zusammengestellten RFLP's ermittelt.

Tabelle 23: Polymorphismus der PCR-Produkte von *fliC* nach FIELDS (*fliC_F*) und MACHADO (*fliC_M*) und ihre Korrelation mit serotypisch ermittelten H-Antigenen und den mit diesen H-Antigenen kombinierten O-Antigenen
(nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)

| H-Antigen | O-Antigen kombiniert mit diesem H-Antigen | RFLP(RsaI) in bp der <i>fliC(F)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(F)</i> Typ | RFLP(CfoI) in bp der <i>fliC(M)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(M)</i> Typ ¹⁾ |
|-----------|---|---|--------------------|---|----------------------------------|
| 1 | 6 | 700, 300, 290, 170, 130, 50, | 12 | 670, 380, 220, 160, 130, 75, 55 | 12-1 |
| 2 | 103, 80, 84, 112, 119, 121, 128 | 580, 400, 310, 120, 70, | 2 | 1300, 220 | 2a |
| 3 | 53 | 380, 310, 290, 280, 150 | 16 | 1100, 220, 140, | 16 |
| 4 | 127 | 580, 370, 80, 70, | 4 | 380, 310, 100, 75, 55 | 17 |
| 4 | 7 | 500, 290, 70, 80, 50 | 44 | 380, 310, 100, 75, 55 | 17 |
| 4 | 2, 113, 25 | - | - | 380, 310, 100, 75, 55 | 17 |
| 5 | 4 | 1300 | 5 | 710, 210, 120, 75, 55 | 5 |
| 6 | 125, 102 | 580, 410, 310, 200, 150 | 6 | 620, 430, 140, 100, 75, 55 | 6 |
| 6 | 2, 74 | 630, 410, 310, 200, 150 | 6-1 | 600, 400, 140, 100, 75, 55 | 6-1 |
| 7 | 1, 2, 18, 55, 157 | 570, 350, 310, 220, 190, 130 | 7 | 600, 340, 200, 190, 120, 75, 55 | 7 |
| 8 | 40, 22, 179, 111 | 700, 310, 280, 150 | 8 | 330, 300, 220, 140, 100 | 8b |
| 8 | 75 | 700, 310, 280, 150 | 8 | 330, 300, 140, 120, 100 | 8a |
| 9 | 36 | 700, 400, 310, 300, 150 | 57 | 720, 450, 220, 200, 140, 75, 55 | 9a |
| 9 | 130 | 1100, 310, 300, 150 | 9 | 720, 450, 220, 200, 120, 75, 55 | 9 |
| 9 | 156, 15 | 400, 350, 310, 220, 190, 130 | 58 | 600, 340, 200, 190, 140, 75, 55 | 7-1 |
| 9 | 104, 178 | 560, 500, 350, 220, 130 | 59 | 600, 340, 200, 190, 120, 75, 55 | 7 |
| 10 | 6, 120, nt, 4, 115, 78, 91, 111, 115 | 570, 310, 50 | 10 | 700, 150, 110, 75, 55 | 10 |
| 11 | 26, 177 | 570, 280, 150 | 11 | 430, 420, 290, 220 | 11 |

Ergebnisse

| H-Antigen | O-Antigen kombiniert mit diesem H-Antigen | RFLP(RsaI) in bp der <i>fliC(F)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(F)</i> Typ | RFLP(CfoI) in bp der <i>fliC(M)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(M)</i> Typ¹⁾ |
|------------------|---|---|---------------------------|---|--|
| 12 | 157, 76 | 700, 410, 290, 170, 130, 50 | 12 | 670, 380, 220, 160, 110, 75, 55 | 12/45 |
| 14* | 91 | 630, 580, 410 | 14 | 700, 340, 240, 120, 75, 55 | 14 |
| 15 | 23 | 440, 310, 280, 220, 70 | 15 | 380, 360, 300, 210, 130, 75, 55 | 15 |
| 16 | 118, 8, 181 | 380, 310, 290, 280, 150, 75 | 16 | 1100, 220, 140 | 16 |
| 17 | 69 | - | - | 380, 310, 120, 75, 55 | 17 |
| 18 | 73, 17, 77, | 720, 580, 200, 100 | 18 | 1300, 210, 140, 75, 55 | 18 |
| 19 | 96, 76, nt, 8, 163, 178 | 640, 635, 280, 240, 70 | 19 | 360, 300, 280, 200, 170, 150, 120, 75, 55 | 19a |
| 19 | 121 | 640, 310, 280, 240, 190, 110, 70 | 19-1 | 360, 300, 280, 200, 170, 150, 130, 75, 55 | 19-1 |
| 20 | 154, 1 | 400, 310, 230, 190, 120, 80 | 20 | 700, 450, 210, 140, 75, 55 | 70 |
| 21 | 91, 146, 40, 30, nt | 380, 310, 280, 210, 150 | 21 | 900, 290, 220 | 21a |
| 23* | 172, 158 | 500, 290, 280, 200, 140 | 23 | 800, 350, 210, 120, 75, 55 | 23 |
| 24 | 51 | 690, 400, 300, 120 | 24 | 620, 430, 120, 75, 55 | 24-1 |
| 25 | 119, 88, 156 | 900, 310 | 25 | 800, 130, 110, 75, 55 | 25b-1 |
| 26 | 38 | 570, 310, 140, 75 | 60 | 290, 270, 210, 170, 150 | 26 |
| 26 | 131 | 800, 550, 250, 70 | 26 | 290, 270, 210, 170, 150 | 26 |
| 27 | 4, 74, 130 | 630, 280, 150, 130 | 27 | 400, 300, 220, 140 | 27 |
| 28 | 4, 74, 84 | 410, 310, 190, 170 | 28 | 490, 400, 350, 130, 75 55 | 28 |
| 28 | 146, 166 | 410, 310, 190, 120, 50 | 28-1 | 490, 400, 350, 130, 75 55 | 28 |
| 28 | 145 | 400, 280, 230, 190, 90 | 61 | 600, 420, 350, 130, 75 55 | 28-1 |
| 29 | 74 | 350, 300, 230, 170, 150, 100 | 29 | 700, 240, 120, 75, 55 | 29 |
| 30 | 38 | 580, 410, 300, 100 | 30 | 370, 250, 210, 130, 120, 90, 75, 55 | 30 |

Ergebnisse

| H-Antigen | O-Antigen kombiniert mit diesem H-Antigen | RFLP(RsaI) in bp der <i>fliC(F)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(F)</i> Typ | RFLP(CfoI) in bp der <i>fliC(M)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(M)</i> Typ ¹⁾ |
|------------------|---|---|--------------------|---|----------------------------------|
| 31 | nt, 83 | 630, 430, 410, 180, 75 | 31 | 900, 350, 110, 75, 55 | 31 |
| 32 | 114 | 710, 500, 310, 120, | 32 | 390, 240, 210, 160, 130, 120, 95, 90, 75, 55 | 32 |
| 33 | 6, 92 | 680, 410, 80, 70, 50 | 33 | 240, 230, 200, 110, 75, 55 | 33 |
| 34 | 86, 145, 160 | 650, 520, 420, 80 | 34 | 700, 300, 150, 130, 90, 75, 55 | 34 |
| 35 | 134 | 650, 580, 300, 280 | 35 | 470, 450, 440, 300, 240, 220 | 35 |
| 36 | 42, 86 | 530, 420, 400, 180 | 36 | 1300, 120, 75, 55 | 71 |
| 37 | 4 | 780, 300, 220, 120, 100 | 37 | 700, 230, 210, 120, 75, 55 | 37 |
| 38 | 69 | 300, 180, 170, 150, 140, 100 | 38 | 1000, 120, 75, 55 | 38 |
| 39 | 74 | 310, 290, 280, 210, 100, 70 | 39 | 350, 210, 160, 130, 75, 55 | 39 |
| 40 | 102 | 280, 240, 230, 150 | 40 | 340, 290, 220, 140, 100 | 8-2 |
| 41 | 137 | 630, 500, 280, 210, 75 | 41 | 650, 450, 150, 140, 130, 75, 55 | 41 |
| 42 | 70 | 630, 310, 300 | 42 | 330, 230, 210, 120, 90, 75, 55 | 72 |
| 42 | 74 | 630, 310, 300 | 42 | 380, 230, 210, 120, 90, 75, 55 | 72-1 |
| 43 | 130 | 300, 180, 170, 150, 140, 100 | 38 | 600, 330, 120, 75, 55 | 43-1 |
| 43 | 140 | 400, 350, 310, 290, 120 | 43 | 460, 320, 145, 110, 75, 55 | 43 |
| 44 | 3 | 500, 290, 80, 70, 50 | 44 | 380, 310, 100, 75, 55 | 17 |
| 45 | 157, 177 | 410, 300, 250, 200, 180, 120, 80 | 45 | 700, 400, 240, 120, 75, 55 | 73²⁾ |
| 46 | 26 | 490, 320, 300, 250, 180, 100, 70 | 46 | 400, 300, 210, 190, 180, 130, 90, 75, 55 | 46 |
| 47 | 86 , nt | 380, 320, 290, 270, 150 | 16-1 | 580, 280, 130, 120 | 47a |
| 48 | 16 | 650, 450, 280, 80 | 48 | 530, 280, 210, 130, 120, 75, 55 | 48 |
| 49 | 6, 181 | 410, 300, 280, 260, 200, 130, 75 | 49 | 550, 350, 180, 140, 130, 120, 75, 55 | 49 |

| H-Antigen | O-Antigen kombiniert mit diesem H-Antigen | RFLP(RsaI) in bp der <i>fliC(F)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(F)</i> Typ | RFLP(CfoI) in bp der <i>fliC(M)</i> -PCR-Produkte | <i>fliC(M)</i> Typ¹⁾ |
|------------------|---|---|---------------------------|---|--|
| 51* | 8 | 350, 290, 250, 240, 200, 150, 100, 75 | 51 | 1000, 250, 210, 120, 75, 55 | 51²⁾ |
| 52 | 11 | 700, 380, 180, 70 | 52 | 330, 240, 210, 190, 130, 75, 55 | 52²⁾ |
| 53 | 148 | - | - | 720, 330, 110 | 53²⁾ |
| 54 | 161 | - | - | 580, 390, 240, 150 | 54 |
| 55 | 75 | 400, 310, 260, 220, 175 | 55 | 850, 350, 290, 130, 90 | 55²⁾ |
| 56 | 139 | 900, 310, 100 | 56 | 440, 230, 160, 130, 90, 75, 55 | 56²⁾ |

* Die Bezeichnungen für H-Antigene H13, H22 und H50 sind nicht vergeben.

- *fliC*-PCR negativ

1) Die Bezeichnung nach MACHADO et al., 2000, korrelierte nicht mit den ermittelten Daten.

2) Diese H-Antigene wurden nicht von MACHADO et al. (2000) bearbeitet, die Ergebnisse entsprachen aber denen in der Methode von FIELDS et al. (1997) ermittelten Werten in Korrelation mit dem Serotyp.

Bei einigen H-Antigenen konnte mehrere *fliC*-RFLP-Typen gefunden werden (Tabelle 24) und einige RFLP-Muster waren bei unterschiedlichen H-Antigenen gleich (Tabelle 25). Für den Komplex H4/H17 könnte die von RATINER (1998) publizierte H-Phasen-Variation die Ursache dieser Beobachtung sein. Das bedeutet, dass di-phasische *E. coli* auftreten können. Alle beobachteten Variationen sind in den Tabellen 24 und 25 zusammengefaßt.

Tabelle 24: Serotypisch definierte H-Antigene mit mehreren *fliC*-RFLP-Mustern
(nach PRAGER, R.; STRUTZ, U.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)

| H-Antigen | <i>fliC</i> (F) –Typ | <i>fliC</i> (M) –Typ |
|-----------|----------------------|----------------------|
| 4 | 4, 44, nt | 17 |
| 7 | 7, 59 | 7 |
| 9 | 9, 57, 58, 59 | 9, 9a, 7, 7-1 |
| 26 | 26, 60 | 26 |
| 28 | 28, 28-1, 61 | 28, 28-1 |
| 43 | 43, 38 | 43, 43-1 |

Tabelle 25: *fliC*-RFLP-Muster mit mehreren serotypisch definierten H-Antigenen
(nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)

| RFLP-Muster | H-Antigen |
|-----------------------|-----------|
| <i>fliC</i> (F) –Typ: | |
| 9 | 7, 9 |
| 12 | 1, 12 |
| 16 | 3, 16 |
| 38 | 38, 43 |
| 43 | 4, 44 |
| <i>fliC</i> (M) –Typ: | |
| 7 | 7, 9 |
| 8 | 8, 40 |
| 12/45 | 1, 12 |
| 16 | 3, 16 |
| 17 | 4, 17, 44 |

4.2.5.2. PCR des *fliC*-Gens von *E.coli*-Stämmen aus Patientenisolaten

Die Anwendung der molekularen Analyse durch PCR des *fliC*-Gens auf Isolate aus der Stammsammlung des NRZ erfolgte insbesondere zur Überprüfung bei *E. coli* selten auftretender O:H-Kombinationen (z.B. O157:H48, O181:H49), zur Klärung durch Serotypie nicht typisierbarer H-Antigene (Hnt) und zur Identifizierung von *fliC* –RFLP-Mustern bei nicht-motilen Stämmen.

Bei 8 der 16 H⁻-Stämme wurde ein *fliC* –RFLP-Muster gefunden, welches einer häufigen O:H-Kombination entspricht (O103:H2, O128:H2, O145:H28, O146:H21, O177:H45, O26:H11, O76:H19, O91:H14) (siehe Tabelle 26). Für die Stämme, welche dem Pathovar EIEC zuzuordnen sowie solchen, die serotypisch als Hnt klassifiziert waren, wurden bisher unbekannte Muster ermittelt. Diese Muster wurden in Fortführung der H-Antigen-Nomenklatur aus der Serotypie mit den Nummern H57 - H69 bezeichnet.

Die Verwendung der Methode nach FIELDS et al. (1997) erwies sich als wenig vorteilhaft. In der Mehrzahl der überprüften Isolate konnte kein identifizierbares PCR-Produkt erzeugt werden, während bei Anwendung der Methode nach MACHADO et al. (2000) in jedem Fall die Musteranalyse ermöglichte (Abbildung 20).

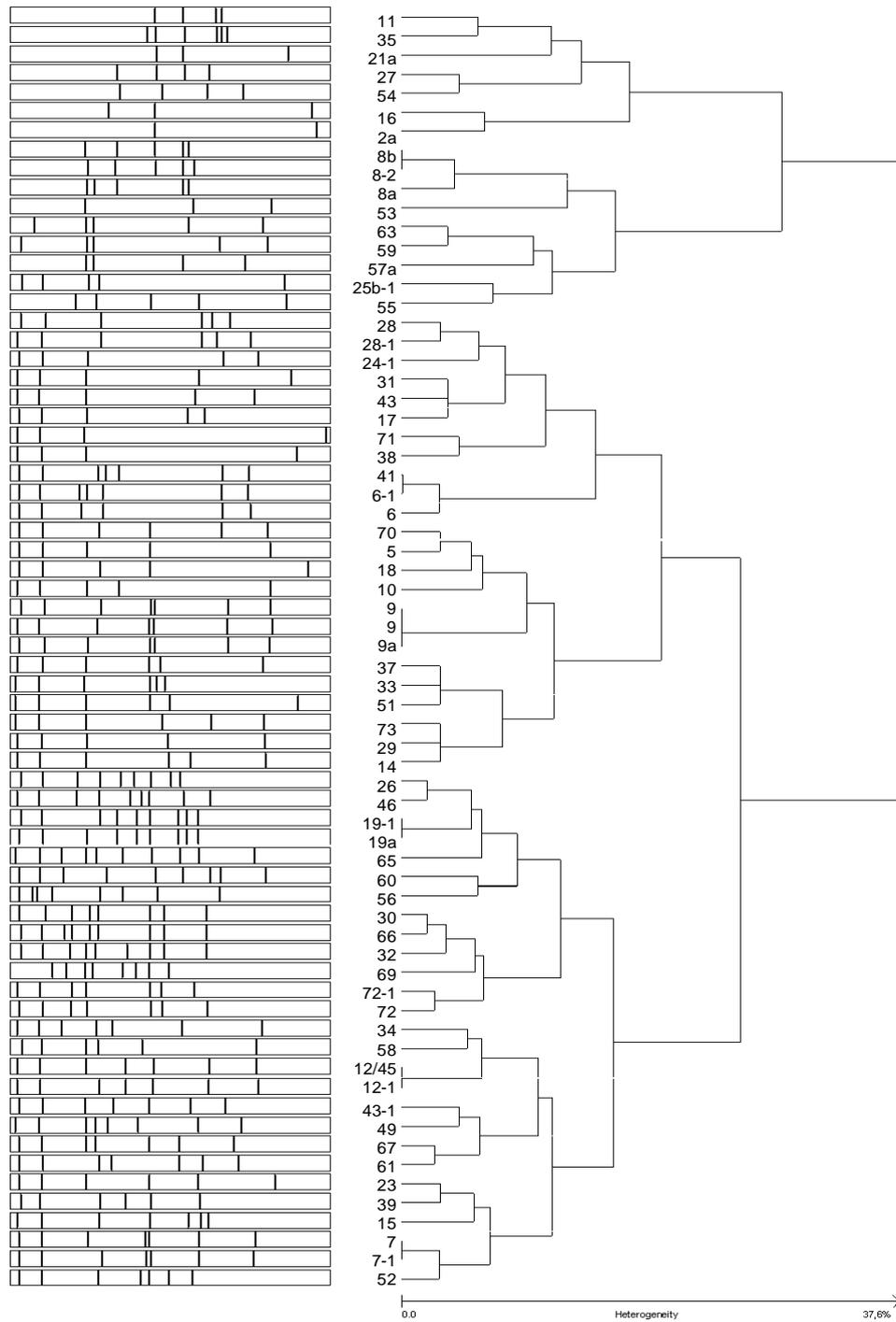
Eine Besonderheit stellte der H4/H17-Komplex auch bei diesen Patientenisolaten dar. Wie schon bei den Referenzstämmen beobachtet, konnte hier bei Stämmen des Serovars O2:H4, O25:H4 und O113:H4 der *fliC*-Typ 17 ermittelt werden, welcher serotypisch durch Verwendung absorbiertes Testseren ausgeschlossen wurde.

Tabelle 26: Überprüfung von *E.coli*-Isolaten aus Patientenmaterial ohne H-Antigen (H⁻) bzw. mit schwer identifizierbarem H-Antigen (Hnt) oder mit H-Antigenen, welche den „mismatching“-Komplexen nach der *fliC*-PCR angehörten (nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)

| RKI-Nr.: | Serovar | Pathovar | fliC(F) | fliC(M) |
|------------|---------------------|----------|---------|---------|
| 98-10037 | O103:H ⁻ | EHEC | - | 2 |
| 00-06616 | O128:H ⁻ | EHEC | - | 2 |
| 01-04454 | O104:H7/9 | EHEC | 59 | 7 |
| 00-02093 | O26:H ⁻ | EHEC | - | 11 |
| 00-00925 | O91:H ⁻ | EHEC | - | 14 |
| 00-04447 | O91:Hnt | EHEC | | 14 |
| 00-08712 | O15:Hnt | EHEC | | 16 |
| 01-01175 | O25:H4 | np | - | 17 |
| 01-02813 | O69:H17 | EHEC | - | 17 |
| 01-04788 | O2:H4 | np | - | 17 |
| 01-09700 | O113:H4 | EHEC | - | 17 |
| 01-11551 | O113:H4 | EHEC | - | 17 |
| 01-12339 | O113:H4 | EHEC | - | 17 |
| 00-03360 | O76:H ⁻ | EHEC | - | 19 |
| 00-06050 | O146:H ⁻ | EHEC | 21 | 21 |
| 01-03804 | O156:Hnt | EHEC | | 25 |
| 03-07930 | O26:H34 | EPEC | 34 | 34 |
| 04-08384 | O26:H34 | EPEC | 34 | 34 |
| 01-01266 | O177:H ⁻ | EHEC | 45 | 45 |
| 01-01907 | O3:H ⁻ | EHEC | 16 - 1 | 47 |
| 00-05871 | O88:H ⁻ | np | 48 | 48 |
| 04-08706 | O157:H48 | np | | 48 |
| 01-02304 | O181:H49 | EHEC | 49 | 49 |
| 98-10281 | O144:H ⁻ | EIEC | - | 58 |
| 00-00795 | O8:H ⁻ | EHEC | - | 58 |
| 00-04298 | O112:H ⁻ | EHEC | - | 59 |
| 98-10280 | O143:H ⁻ | EIEC | 65 | 61 |
| 00-07153 | O74:H ⁻ | np | - | 63 |
| 98-10283 | O164:H ⁻ | EIEC | 66 | 65 |
| 00-00848 | O126:H ⁻ | np | 30 | 66 |
| 00-04915 | O76:Hnt | EHEC | 61 | 69 |
| 01-03709 | Ont:H49 | EHEC | 67 | - |
| 00-03447 | O145:H ⁻ | EHEC | 61 | 28 - 1 |
| 00-02619 | O15:H7/9 | np | 58 | 7 - 1 |
| 01-00592 | O156:H7/9 | EHEC | 58 | 7 - 1 |
| 00-05700 | O146:H21 | EHEC | 21 | 21a |
| 00-05159-2 | O91:H8 | EHEC | 8 | 8a |
| 00-00793 | O179:H8 | EHEC | 8 | 8b |
| 00-09211 | O179:H8 | EHEC | 8 | 8b |

Abbildung 20: *fliC*-Typen nach der Methode von MACHADO et al., 2000

(nach PRAGER, R.; STRUTZ, U., FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; 2003)



4.3. Standard Operation Procedure (SOP)

Aus den Ergebnissen zur Optimierung der Anzuchtsbedingungen und zur Durchführung der Agglutinationsreaktion in Mikrotiterplatten konnte ein standardisierbares Verfahren entwickelt werden, welches als „Standard Operation Procedure“ (SOP) für die Anwendung zur Serotypie von *Escherichia coli* O- und H-Antigenen gelten kann (Abbildung 21).

Molekular abgesichert wurden die Ergebnisse durch Anwendung der LPS-Musteranalyse für die O-Antigen-Bestimmung und der *fliC*-PCR für die H-Antigen-Bestimmung.

Die Anwendung in der Routinebearbeitung von *E. coli*-Isolaten am NRZ konnte den Anteil der durch Serotypie nicht typisierbare Isolate reduzieren, und ermöglichte die Beschreibung 6 neuer Serovare.

Mit Hilfe der hier aufgestellten SOP gelang es die in der Einleitung skizzierte Unvergleichbarkeit der Serotypie-Ergebnisse im internationalen Maßstab zu beseitigen und Ringversuche (EQA) sinnvoll erscheinen zu lassen.

Die in Tabelle 27 aufgeführten Stämme der Ringversuche 2002 und 2003 wurden korrekt identifiziert.

Tabelle 27: Ringversuch-Stämme für die Serotypie, bearbeitet im europäischen Netzwerk EnterNet der Jahre 2002 und 2003

| RKI-Nr. | Original-Nr. | O-Ag | H-Ag | SD in mm/ d |
|----------|--------------|------|------|-------------|
| 02-04531 | AA1 | 137 | 6 | 125/2 |
| 02-04532 | BB2 | 9 | 21 | 125/1 |
| 02-04533 | CC3 | 9 | 11 | 125/1 |
| 02-04534 | DD4 | 26 | 11 | 125/2 |
| 02-04535 | EE5 | 157 | 16 | 125/1 |
| 02-04536 | FF6 | 113 | 6 | 125/1 |
| 02-04537 | GG7 | 157 | 16 | 125/1 |
| 02-04538 | HH8 | 55 | 7 | 125/1 |
| 02-04539 | II9 | 157 | 7 | 125/1 |
| 02-04540 | JJ10 | 121 | 45 | 125/1 |
| 02-04541 | KK11 | 145 | 34 | 125/1 |
| 02-04542 | LL12 | 103 | 2 | 125/1 |
| 02-04543 | MM13 | 111 | 19 | 125/1 |

| RKI-Nr. | Original-Nr. | O-Ag | H-Ag | SD in mm/ d |
|----------------|---------------------|-------------|-------------|--------------------|
| 03-02909 | AA1 | 157 | 7 | 125/1 |
| 03-02910 | BB2 | 26 | 11 | 125/1 |
| 03-02911 | CC3 | 103 | 2 | 125/1 |
| 03-02912 | DD4 | 111 | 8 | 125/2 |
| 03-02913 | EE5 | 113 | 21 | 125/3 |
| 03-02914 | FF6 | 177 | 6 | 125/1 |
| 03-02915 | GG7 | 55 | (10) | 12/10 |
| 03-02916 | HH8 | 121 | 19 | 125/1 |
| 03-02917 | II9 | 145 | 28 | 125/1 |
| 03-02918 | JJ10 | 117 | 7 | 125/1 |

In Abbildung 21 ist die Arbeitsvorschrift als Standard Operation Procedure in einer für das Robert Koch-Institut empfohlenen Mastervorlage dargelegt.

Sie wird in diesem Verfahren für die serotypische Identifizierung der O- und H-Antigene von *E. coli* am NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, angewandt.

Abbildung 21: Standard Operation Procedure (SOP) für die Serotypie der O- und H-Antigene von *Escherichia coli*

| | | |
|--|-----------------------------------|---|
| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  |
| Datum: 15.11.2004 | | |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> -Isolaten | | |
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 1 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |
| Anlagen: 4 Arbeitsexemplar: Informationsexemplar: x | | |
| <p>Verteiler: Verbindlich für:</p> <p>Fachgruppenleitung: Diagnostischer Bereich: Archivverantwortliche Person: Qualitätssicherung und Dokumentation:</p> <p>Zur Information an:</p> <p>Institutsleitung:</p> | | |
| <p>Inhaltsverzeichnis</p> <p>1. Geräte und Material 2. Durchführung 3. Entsorgung 4. Literatur</p> | | |
| erstellt: geprüft: gültig ab: | | |

| | | |
|---|-----------------------------------|---|
| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  |
| Datum: 15.11.2004 | | |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> -Isolaten | | |
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 2 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |
| <p>1. Geräte und Material</p> <p>1.1. Geräte</p> <p>Brutschrank: Typ 6760 (KENDRO, D) Brutschrank: Typ 6060 (KENDRO, D) Wasserbad: Typ 501 (GFL, D) Sicherheitswerkbank: Hera Safe, Typ HS 12 (KENDRO, D) Pipettierhilfen: Eppendorf Research® pro mit Ladeständer, Einkanal 5 – 100µl; Eppendorf Research® variabel, 20-200µl, 100-1000µl (eppendorf, D) Külschrank (Liebherr, D) Ablesespiegel (Dynex, NL)</p> <p>1.2. Material</p> <p>Mikrotiterplatten (MTP): 96 Well PS Microplatten, U-Form (Greiner, D) Probenröhrchen: PS Zellkultur Röhrchen, 18x95 (Greiner, D) Pipettenspitzen: epTIPS Standard gelb; blau (eppendorf, D) Blutagarplatten: RKI, Labor für Nährmedien (LfN) O-Antigen-Bouillon: RKI, LfN U-Rohr mit Schwärmagar: RKI, LfN H-Antigen-Bouillon: RKI, LfN PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pH 7,2-7,5: RKI, LfN 1% PBS-Formalin: RKI, LfN Testseren für O-Antigene (1 - 181): RKI, Eigenherstellung Testseren für H-Antigene (1 - 56): RKI, Eigenherstellung Aufbewahrungsbehälter für MTP, PVC (Roth, D)</p> | | |

| | | |
|---|---|---|
| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  |
| | | Datum: 15.11.2004 |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> -Isolaten | | |
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 3 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |
| <p>2. Durchführung</p> <p>2.1. Vorbereitung</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fraktionierter Ausstrich eines biochemisch charakterisierten Isolats von <i>Escherichia coli</i> auf eine Blutagarplatte (siehe Anlage 1) • Inkubation der Blutagarplatte für 18 h bei 37°C <p>2.2. Bestimmung der O-Antigene (Agglutination)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Animpfen von 5 ml O-Antigen-Bouillon mit der Hälfte einer gewachsenen Einzelkolonie • Inkubation der Bouillon für 18 h bei 37°C • Erhitzen der Bouillon für 1 h bei 95°C • Testung der O-Antigen-Bouillon mit O-Antigen-Testseren (1-181): <ul style="list-style-type: none"> Schritt 1: Verwendung von gepoolten Seren A-W (siehe Anlage 2): <ul style="list-style-type: none"> - Mischen von je 25µl Bouillon und 25µl Poolserum pro Well in einer MTP (incl. 1x 25µl PBS + 25µl Bouillon als Kontrolle) - Inkubation der MTP für 18 h bei 50°C - Auswerten der Agglutinationsreaktionen mit Hilfe des Ablesespiegels (positiv = großflächige Trübung; negativ = punktförmige Ablagerung am Boden des Wells) Schritt 2: Verwendung der Einzelseren des positiv getesteten Poolserums wie unter Schritt 1 beschrieben Schritt 3: Verwendung des positiven Einzelserums / der positiven Einzelseren zur Titration <ul style="list-style-type: none"> - Herstellung einer Verdünnungsreihe mit PBS aus dem Serum, beginnend mit 1:40 über 9 Stufen bis 1:5120, in einer MTP (Well 1-10) - Hinzufügen von 25µl O-Antigen-Bouillon je Well - Inkubation und Auswertung wie unter Schritt 1 | | |

| | | |
|--|-----------------------------------|---|
| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  |
| Datum: 15.11.2004 | | |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> -Isolaten | | |
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 4 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |
| <p>2.3. Bestimmung der H-Antigene (Agglutination)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Animpfen von einem U-Rohr (Schwärmagar) mit der Hälfte einer gewachsenen Einzelkolonie • Inkubation des U-Rohrs für 18 h bei 37°C • Bei Wachstum im gesamtem U-Rohr, eine weitere Passage erzeugen (Animpfen von 25µl Agar aus der bewachsenen Seite auf ein neues U-Rohr) • Inkubation für 18 h bei 37°C • Bei Wachstum im gesamtem U-Rohr, Animpfen einer Antigen-Boillon (5ml) mit 25µl Agarsuspension aus der bewachsenen Seite des U-Rohrs • Inkubation für 18 h bei 37°C • Abtöten der Bakterien mit 500µl 1% PBS-Formalin • Testung der H-Antigen-Bouillon mit H-Antigen-Testseren (1-56) wie unter 2.2. Schritt 1 – 3 für die Agglutination der O-Antigene beschrieben | | |

| | | |
|--|-----------------------------------|---|
| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  |
| | | Datum: 15.11.2004 |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> -Isolaten | | |
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 5 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |
| <p>3. Entsorgung</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sammeln und Autoklavieren des biologischen Materials in Entsorgungsbeuteln: RKI, LfN • Desinfektion und Sterilisation der Arbeitsplätze und des Arbeitsmaterials entsprechend Arbeitsanweisung gemäß Betriebshandbuch des RKI • Durchführung sämtlicher Arbeiten gemäß GLP durch entsprechend qualifiziertes Personal <p>4. Literatur</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ørskov , F., and I. Ørskov . 1984. Serotyping of <i>Escherichia coli</i>, p 43 -112. In T. Bergan (ed.), Methods in Microbiology, vol.1 Academic Press, London • Prager , R., Strutz , U., Fruth, A., and H. Tschäpe . 2003. Subtyping of pathogenic <i>Escherichia coli</i> strains using flagellar H-antigens: serotyping versus <i>fliC</i> polymorphism . Int. J. Med. Microbiol . 292: 477 -486 | | |

| | | |
|---|-----------------------------------|---|
| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  |
| | | Datum: 15.11.2004 |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> - Isolaten | | |
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 6 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |
| <p>Anlage 1: Fraktionierter Ausstrich von <i>E.coli</i> auf Blutagar</p>  | | |

| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  |
|--|-----------------------------------|---|
| Datum: 15.11.2004 | | |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> - Isolaten | | |
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 7 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |
| Anlage 2: Pools der O - Antigen - Testseren | | |
| Pool | Anzahl Seren | O-Antigen |
| A | 6 | 1-2-50-53-74-149 |
| B | 5 | 3-23-28ac-38-115 |
| C | 5 | 4-16-18ab-18ac-19 |
| D | 8 | 5-7-39-65-70-71-114-116 |
| E | 5 | 6-9-30-55-57 |
| F | 5 | 8-46-60-75-93 |
| G | 6 | 17-44-77-106-111-113 |
| H | 6 | 25-26-62-68-73-102 |
| I | 7 | 12-15-40-78-87-92-96 |
| J | 8 | 13-21-22-32-34-83-85-140 |
| K | 8 | 14-20-107-117-118-123-138-148 |
| L | 6 | 86-88-90-127-128ab-141 |
| M | 11 | 10-11-24-27-28ab-29-33-36-37-41-56 |
| N | 11 | 42-43-45-48-49-51-52-54-58-59-61 |
| O | 12 | 63-64-66-69-76-79-80-81-82-112ab-144-150 |
| P | 12 | 84-89-91-95-97-98-99-100-101-103-104-105 |
| Q | 11 | 108-109-110-119-120-121-124-125-126-130-131 |
| R | 9 | 132-134-136-137-142-143-145-146-170 |
| S | 9 | 35-129-133-135-139-147-171-172-173 |
| T | 7 | 151-152-153-154-155-156-157 |
| U | 12 | 158-159-160-161-162-163-164-165-166-167-168-169 |
| W | 8 | 174-175-176-177-178-179-180-181 |

| | | |
|--|---|--|
| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  Datum: 15.11.2004 |
|--|---|--|

Serotypisierung von *Escherichia coli* -Isolaten

| | | |
|--------------------------------|--------------------|---------------|
| SOP – Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 8 von 9 |
| Ersetzt SOP – Nr.: entfällt | | Revision: 0 |

Anlage 3: Schematische Darstellung des Mikrotiterplatten-Assays für die O-Antigen-Agglutination

1. Schritt:
Poolserum
positiv: Pool H

2. Schritt:
Einzelserum
positiv: O26
O68

3. Schritt:
Titration
positiv: O26

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|----|----|----|-----|---|---|---|----|----|----|
| A | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L |
| B | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | W | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | 25 | 26 | 62 | 68 | 73 | 102 | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | 26 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| H | 68 | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |

| Robert Koch Institut Bereich Wernigerode Burgstrasse 37 38855 Wernigerode | Standardarbeitsanweisung (SOP) | ROBERT KOCH INSTITUT  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|---|------|--------------|-----------|---|---|-------------|---|---|------------|---|---|---------------|---|---|---------------|---|---|----------------|---|---|----------------|---|---|----------------|---|---|----------------|---|---|----------------|---|---|-------------------------|
| Datum: 15.11.2004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Serotypisierung von <i>Escherichia coli</i> -Isolaten | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SOP-Nr.: 1 | Version 1.0 | Seite 9 von 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ersetzt SOP- Nr.: entfällt | | Revision: 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Anlage 4: Pools der H-Antigen-Testseren | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Pool</th> <th style="text-align: center;">Anzahl Seren</th> <th style="text-align: left;">H-Antigen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>1-2-3-12-16</td> </tr> <tr> <td>B</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>4-5-6-9-17</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>8-11-21-40-43</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>7-10-14-15-18</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>19-20-23-24-25</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>26-27-28-29-31</td> </tr> <tr> <td>G</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>30-32-34-36-41</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>33-35-37-38-45</td> </tr> <tr> <td>I</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td>39-42-44-46-47</td> </tr> <tr> <td>J</td> <td style="text-align: center;">8</td> <td>48-49-51-52-53-54-55-56</td> </tr> </tbody> </table> | | | Pool | Anzahl Seren | H-Antigen | A | 5 | 1-2-3-12-16 | B | 5 | 4-5-6-9-17 | C | 5 | 8-11-21-40-43 | D | 5 | 7-10-14-15-18 | E | 5 | 19-20-23-24-25 | F | 5 | 26-27-28-29-31 | G | 5 | 30-32-34-36-41 | H | 5 | 33-35-37-38-45 | I | 5 | 39-42-44-46-47 | J | 8 | 48-49-51-52-53-54-55-56 |
| Pool | Anzahl Seren | H-Antigen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 5 | 1-2-3-12-16 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 5 | 4-5-6-9-17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 5 | 8-11-21-40-43 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 5 | 7-10-14-15-18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 5 | 19-20-23-24-25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 5 | 26-27-28-29-31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 5 | 30-32-34-36-41 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 5 | 33-35-37-38-45 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 5 | 39-42-44-46-47 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| J | 8 | 48-49-51-52-53-54-55-56 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

4.4. Anwendung bei epidemiologischem Material

Die Serotypisierung von *E. coli*-Stämmen stellt als „Gold-Standard“ die Grundlage für die Subdifferenzierung dieser Spezies dar. Insbesondere für eine weiterführende diagnostische und epidemiologische Betrachtung ist sie von entscheidender Bedeutung.

Aus den Einsendungen der Jahre 1998-2004 an das NRZ konnten so Untersuchungen zur Häufigkeitsverteilung von *E. coli*-Serovaren und ihr Auftreten in einem zeitlichen Verlauf durchgeführt werden. Der bedeutendste Teil der Isolate entstammte dem Pathovar EHEC, was zum einen aus der klinischen Bedeutung dieses Pathovars und zum anderen aus den Problemen bei der Diagnostik der Erreger resultiert (siehe FRUTH et al., 2000). Aber auch Isolate anderer intestinaler und extraintestinaler *E. coli*, sowie *E. coli* aus verschiedenen Umwelthabitaten wurden serotypisch klassifiziert. In Abbildung 22 ist die Häufigkeitsverteilung der *E. coli*-Serovare (ohne Berücksichtigung der Pathovare) in Deutschland am Beispiel des Jahres 2004 zusammengefasst. In Tabelle 28 sind die selteneren Serovare mit einer Häufigkeit unter 2% aufgeführt. Sie entsprechen in der Summe dem Anteil von 27% „andere Serovare“ im Diagramm der Abbildung 22. Im Anteil der 14% Ont-Stämme sind nur 3% der neuen Serovare OX187-OX192 enthalten. Das spricht dafür, dass weitere neue O-Typen zu erwarten sind.

Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der *E. coli*-Serovare aus Einsendungen an das NRZ im Jahr 2004 (Anzahl Isolate n = 1092)

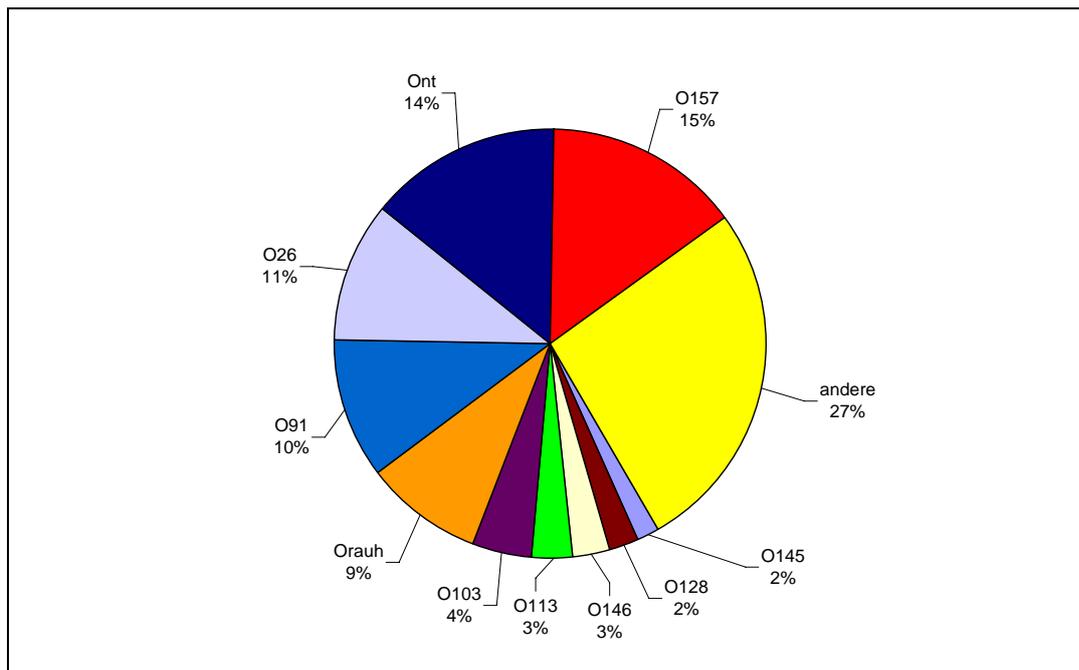


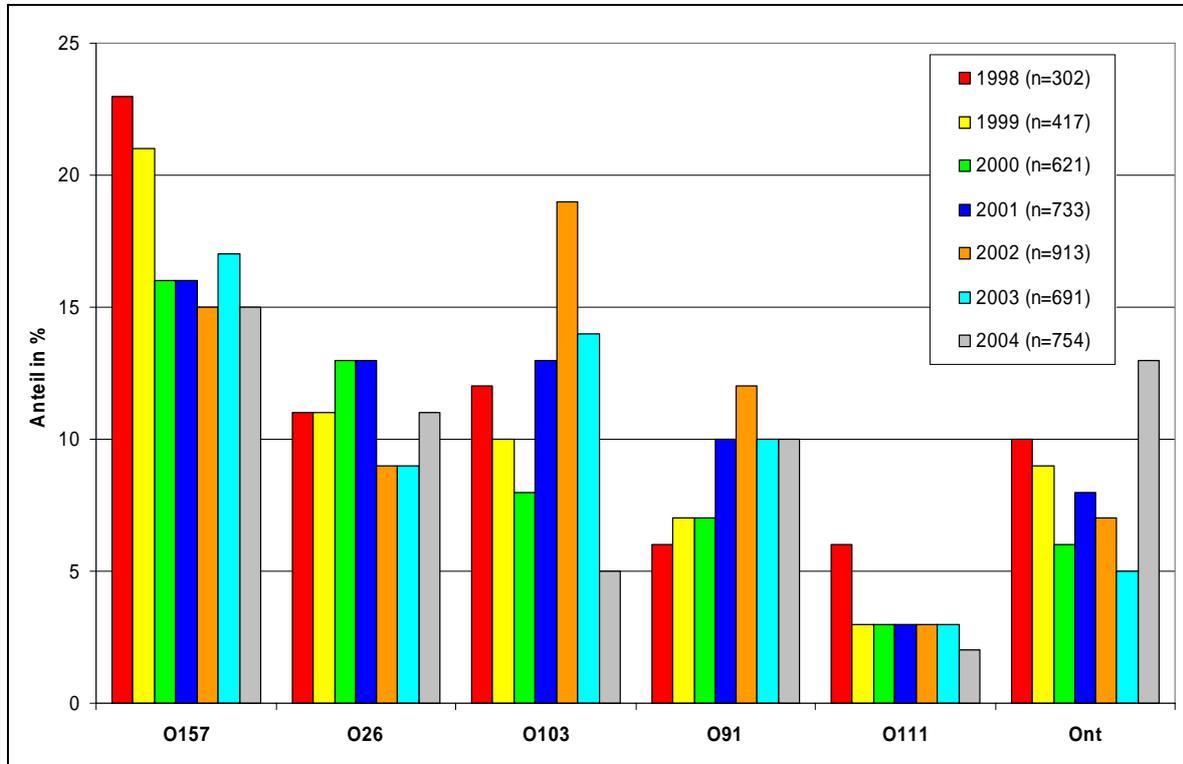
Tabelle 28: Auflistung der Serovare aus Einsendungen an das NRZ im Jahr 2004
mit einer Häufigkeit unter 2%

| Serovar | Anzahl der Isolate (n) | Anteil (%) |
|---------|------------------------|------------|
| O1 | 2 | 0,2 |
| O2 | 9 | 0,9 |
| O3 | 4 | 0,4 |
| O4 | 5 | 0,5 |
| O5 | 13 | 1,3 |
| O6 | 11 | 1,1 |
| O7 | 2 | 0,2 |
| O8 | 17 | 1,7 |
| O9 | 4 | 0,4 |
| O15 | 5 | 0,5 |
| O16 | 3 | 0,3 |
| O17 | 1 | 0,1 |
| O18 | 5 | 0,5 |
| O21 | 3 | 0,3 |
| O22 | 9 | 0,9 |
| O23 | 4 | 0,4 |
| O25 | 4 | 0,4 |
| O28 | 1 | 0,1 |
| O39 | 1 | 0,1 |
| O40 | 3 | 0,3 |
| O55 | 14 | 1,4 |
| O63 | 4 | 0,4 |
| O69 | 3 | 0,3 |
| O73 | 2 | 0,2 |
| O74 | 4 | 0,4 |
| O75 | 7 | 0,7 |
| O76 | 11 | 1,1 |
| O77 | 4 | 0,4 |
| O78 | 6 | 0,6 |
| O80 | 1 | 0,1 |
| O82 | 1 | 0,1 |
| O84 | 1 | 0,1 |
| O86 | 6 | 0,6 |
| O87 | 2 | 0,2 |
| O88 | 1 | 0,1 |
| O90 | 2 | 0,2 |
| O98 | 3 | 0,3 |
| O100 | 1 | 0,1 |
| O106 | 4 | 0,4 |
| O111 | 14 | 1,4 |
| O114 | 1 | 0,1 |
| O115 | 3 | 0,3 |
| O116 | 2 | 0,2 |
| O117 | 4 | 0,4 |

| Serovar | Anzahl der Isolate (n) | Anteil (%) |
|---------|------------------------|------------|
| O118 | 6 | 0,6 |
| O119 | 2 | 0,2 |
| O121 | 3 | 0,3 |
| O123 | 1 | 0,1 |
| O130 | 1 | 0,1 |
| O132 | 1 | 0,1 |
| O135 | 1 | 0,1 |
| O136 | 3 | 0,3 |
| O142 | 2 | 0,2 |
| O147 | 2 | 0,2 |
| O148 | 1 | 0,1 |
| O150 | 1 | 0,1 |
| O152 | 1 | 0,1 |
| O153 | 2 | 0,2 |
| O154 | 3 | 0,3 |
| O156 | 5 | 0,5 |
| O158 | 1 | 0,1 |
| O163 | 1 | 0,1 |
| O165 | 2 | 0,2 |
| O166 | 6 | 0,6 |
| O167 | 1 | 0,1 |
| O174 | 12 | 1,2 |
| O175 | 4 | 0,4 |
| O176 | 2 | 0,2 |
| O177 | 17 | 1,8 |
| O178 | 3 | 0,3 |
| O179 | 3 | 0,3 |
| O181 | 1 | 0,1 |
| Summe | 295 | |

In Abbildung 23 ist die Häufigkeitsverteilung der bedeutendsten Serovare des Pathovars EHEC in den Jahren 1998-2004 dargestellt. Obwohl die Verteilung der Serovare gewissen Schwankungen unterlag, kann dennoch der *E. coli*- Serovar O157 derzeit als der Häufigste bezeichnet werden, gefolgt von den Serovaren O26, O103 und O91. Diese 4 Serovare stellen zusammen die Hälfte aller auftretenden Serovare des Pathovars EHEC gegenwärtig dar.

Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der bedeutendsten *E. coli*-Serovare des Pathovars EHEC in Deutschland aus den Jahren 1998-2004 (Einsendungen an das NRZ)



5. Diskussion

5.1. Entwicklung einer SOP und Absicherung durch Analyse der molekularen Grundlagen

Die Serotypie von *Escherichia coli* hat seit ihrer Einführung 1945 durch KAUFFMANN und VALHNE nichts an ihrer Bedeutung verloren. Sie ist im Gegenteil durch die Erfassung einer Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren dieser Spezies, für die Beschreibung und Analyse insbesondere bei epidemiologischen oder evolutionsgenetischen Untersuchungen besonders wichtig. Hier steht die Vergleichbarkeit von Isolaten unterschiedlicher Herkunft im Vordergrund.

Die Definition der Antigene kann weiterhin, wie bei anderen Spezies auch (z.B. Salmonellen) als Klassenmerkmal dienen. Für *E. coli* sind derzeit 181 O-Serotypen und 56 H-Serotypen beschrieben, aus denen sich über 2000 Serovare ergeben (bei Salmonellen ca. 2500). Die Serotypie nimmt damit eine zentrale Stellung in der Hierarchie der Typisierungsmethoden für epidemiologische und evolutionsgenetische Zwecke ein (siehe Abbildung 23). Die korrekte Anwendung der Methode, ihre internationale Standardisierung durch SOP und die Absicherung der serologischen Ergebnisse mit molekularen Methoden für alle bisher beschriebenen Serovare ist deshalb von besonderer Bedeutung und war Ziel dieser Arbeit.

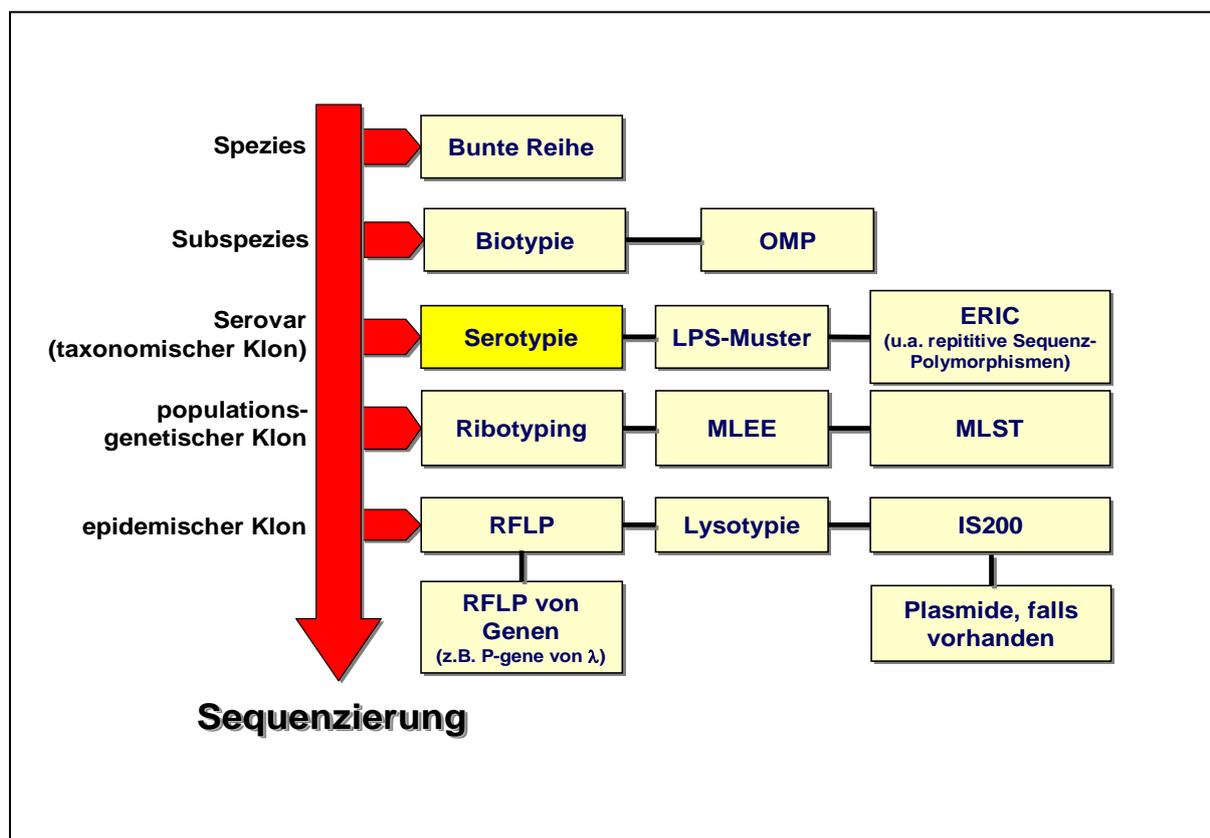
5.1.1. Bedeutung einer SOP für die Serotypie von *E.coli*

Durch den horizontalen Gentransfer mit Hilfe zahlreicher verschiedener mobiler genetischer Elemente (Plasmide, Phagen, Pathogenitätsinseln –PAI's , usw.) besteht ständig die Möglichkeit der Bildung neuer besonders gut an ökologische Bedingungen adaptierter Keime von humanpathogener Bedeutung. Als Beispiel für die Entstehung ständig neuer Erregervarianten von *E. coli* sind sicherlich die Shigatoxin bildenden Stämme zu bezeichnen, die durch Intergration lambdoider Phagen mit verschiedenen Shigatoxin kodierenden Gensequenzen entstanden sind. Sie wurden 1977 durch KONOWALCHUK erstmals beschrieben und sind heute im Pathovar EHEC bzw. STEC in einer großen Erregervielfalt zusammengefasst. Die anderen Pathovare von *E. coli* unterliegen ähnlichen Veränderungen, jedoch gilt ihnen speziell in Europa nicht diese Aufmerksamkeit.

In Asien, Australien und Südamerika kommen hingegen EPEC-Stämme sehr häufig vor (GIRALDI et al., 1990, ROBINS-BROWNE et. al., 2004). Bei diesem Pathovar ist ein Shift von derzeit als „typische“ EPEC bezeichneten Keimen zu sogenannten „atypischen“ EPEC zu verzeichnen (BLANCO et al., 2003). Diese atypischen EPEC sind dadurch charakterisiert, dass sie das Virulenzplasmid EAF nicht enthalten, sondern nur die Pathogenitätsinsel LEE (locus of enterocyte attaching and effacement) besitzen. Solche atypischen EPEC können ebenfalls als „Vorläufer“ für STEC fungieren und dann besonders pathogene Varianten dieses Pathovars darstellen (MELLMANN et al. 2005, in Vorbereitung).

Erkennt man diagnostisch die Pathovare von *E. coli* mit Hilfe der Analyse der Virulenzfaktoren, so stellt die Serotypie eine übergreifende und generelle Subdifferenzierungsmethode dar. Obwohl die Serotypie heute nicht mehr zur taxonomischen Differenzierung als geeignet angesehen werden kann (z.B., wurden Salmonella Serovare früher als Spezies aufgefasst: früher *S. typhimurium* ; heute: *S. enterica* Serovar Typhimurium, mit der Antigenformel O 1,4,[5],12 : i : 1,2) bleibt sie doch im Zusammenspiel mit den anderen Methoden (siehe Abbildung 24) eine quasi taxonomische „Größe“.

Abbildung 24: Bedeutung der Serotypie in der Hierarchie der Typisierungsmethoden für *E. coli*



Der bisherige internationale Stand der Serotypie von *E. coli* (im Gegensatz zur Serotypie von Salmonellen) war unbefriedigend und konnte nur von Spezialisten (z.B. Nationalen Referenzzentren) relativ verlässlich durchgeführt werden (ZHANG et al., 2000).

Dies lag bzw. liegt im Wesentlichen darin begründet, dass nach wie vor die Mehrzahl der Labore, analog zur traditionellen Serotypie von Salmonellen und anderen Enterobacteriaceae, als Methode einen Agglutinationstest auf Objektträgern bevorzugen. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt im Wesentlichen darin begründet, dass die Vielfalt der kreuzreagierenden Antigene nicht aufgelöst wird und Fehlinterpretationen vorprogrammiert sind.

Die Aufgabe einer serotypischen Erfassung von *E. coli* sollte aber nicht nur Speziallaboren vorbehalten sein.

Es bestand deshalb in dieser Arbeit die Notwendigkeit, die Serotypie von *E. coli* zu überarbeiten, ggf. neu zu optimieren oder zu negieren. Aufbauend auf den grundlegenden Publikationen von ØRSKOV und ØRSKOV (1984, 1992) sowie GUINEE et al.(1972) und BETTELHEIM und THOMPSON (1987) ist es in Zusammenarbeit mit der WHO-Zentrale in Kopenhagen, DK, und dem HPA in London-Colindale, GB, durch die hier zusammengestellten Daten gelungen, eine solche standardisierte Methode als Agglutinationstest in Mikrotiterplatten zu entwickeln, und als verlässliche Methode abzusichern (Mikrotiterassay, Abbildung 21).

Da bereits eine Vielzahl von Nährmedien für die Anzucht ausgetestet worden war, wurde die Anzucht auf einen Vergleich des bis dahin verwendeten Nähragars mit dem in unserem Labor für die Anzucht von EHEC für die Bearbeitung von Virulenzfaktoren in der PCR-Diagnostik verwendeten Enterohämolysinagars beschränkt. Es konnte bestätigt werden, dass die Serotypie nach Wachstum auf Nähragar zuverlässig möglich ist und hinsichtlich der Ausbildung der O- oder H-Antigene keine Unterschiede zum Wachstum auf Enterohämolysinagar feststellbar waren (Tabellen 8, 20, 21). Die Verwendung des Enterohämolysinagars stellte jedoch einen entscheidenden Vorteil dar. Auf diesem Nährmedium konnte sehr gut zwischen morphologisch differenten Kolonien unterschieden und damit eine einheitliche Kultur von einer Mischkultur getrennt werden. Deshalb wurde für die weiteren Bearbeitungsschritte dieser Enterohämolysinagar ausgewählt.

Für die Bearbeitung als standardisiertem Test in Mikrotiterplatten war es erforderlich die gewachsenen Kolonien vom festen Nährmedium in ein flüssiges Medium zu überführen. An dieser Stelle wurden die bereits publizierten Medien und Inkubationsbedingungen für O-Antigene beibehalten (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984). Es wurde ausschließlich überprüft, welchen Einfluss die Konzentration der einzusetzenden Bouillon auf die Eindeutigkeit der

Ermittlung der Agglutinationsresultate hatte. Ähnlich der Äquivalenzkurve bei Antigen-Antikörper-Reaktionen für lösliche Antigene, konnte auch hier eine Abhängigkeit von der Konzentration partikulärer Antigene festgestellt werden (Abschnitt 4.1.2). Hierfür zeichnet der Anteil freier LPS in der Bouillon verantwortlich, der stammspezifisch sehr variabel sein kann (KEENLEYSIDE und WHITFIELD 1999). Es kommt zu einer Reaktion mit spezifischen Antikörpern des Testserums, welche für die Reaktion von partikulärem Antigen in der Agglutinationsreaktion dadurch nicht mehr zur Verfügung stehen. Für die Standardisierung der Methode ergab sich unserer Ansicht jedoch nur die Konsequenz, dass diejenigen Isolate, welche bei optimaler Anreicherung KBE von $2,5 \times 10^9$ erreichen, aber serotypisch nicht eindeutig charakterisierbar sind, im Weiteren zuerst durch erneute Testung mit verdünnter Ausgangsbouillon geprüft werden sollten (siehe Abschnitt 4.1.2., Tabelle 8). Eine parallele Bearbeitung mehrerer Einzelkolonien ist hierbei als zusätzliche Kontrolle empfehlenswert (wie auch bei der Bestimmung von H-Antigenen gezeigt, siehe Abschnitt 4.2.1.).

Von grundlegender Bedeutung für diese Methode ist die Kenntnis der kreuzreagierenden Eigenschaften der Testseren. Diese stimmen in der Regel mit den bereits bekannten Eigenschaften auf Grund von Antigenverwandschaften (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984, KNIREL et al. 1994, JANN et al. 1992, GUPTA et al. 1992, JANSSON, 1999) überein. Abhängig von der Herstellung der Testseren (Tiermaterial, Antigen-Präparation) können auch weitere, bisher nicht beobachtete Reaktionen auftreten. Auch bei unseren produzierten Testseren ergaben sich derartige Reaktionen. (Abschnitt 4.1.4., Tabelle 20). Sie werden nicht allein durch bereits erwähnte Antigenverwandschaften erzeugt. Durch die polyklonalen Testseren werden nicht nur Einzel epitope, sondern mehrere Epitope erfasst, die z.B. ebenso Antigene der Core-Region anzeigen, und so nur Kreuzreaktion vortäuschen. Es können auch nicht vollständig gebildete LPS-Moleküle (insbesondere unter Stressbedingungen) auftreten und dadurch bestimmten anderen Serovaren zugeordnet werden (FRIRDICH et al., 2003). Ebenso treten derartige Effekte bei LPS mit modifizierten Seitenketten auf (Acetylierungen, Sialinylierungen etc.) (GAMIAN et al., 1994, SELTMANN und HOLST, 2002). Mit der Optimierung der Methode als SOP und deren Einführung Mitte 2001 nahm der Anteil der dokumentierten Kreuzreaktionen bei den Routineeinsendungen an das NRZ jedoch ab (Abschnitt 4.1.4., Abbildung 9). Das deutet darauf hin, dass durch die bevorzugten und definierten Anreicherungsbedingungen der Anteil komplett ausgebildeter und in der Außenmembran verankerter LPS bei der Mehrzahl der *E. coli*-Isolate hoch genug ist, um

keine oder nur wenige uneindeutige Agglutinationsreaktionen zu bedingen. Ein weiterer Vorteil ist eindeutig darin zu sehen, dass die Anwendung der Methode in Mikrotiterplatten die Erfassung von Agglutinationsreaktionen mit mehreren Testseren gleichzeitig sichtbar machen kann. Hierdurch wird ein Stamm-spezifischer Überblick über die Reaktionen mit allen derzeit verfügbaren 181 O-Antigen-Testseren in einem Schritt ermöglicht (siehe Abbildung 5).

Für die Testung von *E. coli*-O-Antigenen steht eine Palette von polyklonalen Testseren (aus Kaninchen) aus eigener Herstellung und z.T. auch kommerziell zur Verfügung. Die bekanntesten Anbieter sind derzeit die Firmen: SIFIN GmbH, D, SSI Kopenhagen, DK, Denka Seiken, JPN. Diese Produkte werden in der Regel für die Serotypisierung mittels Objektträgeragglutination in einer so genannten Gebrauchsverdünnung angeboten. Solche Testseren stellen für einen breiten Bereich der mikrobiologischen Diagnostik, national wie auch international, die einzige Möglichkeit dar, *E. coli*-Isolate näher zu charakterisieren (wenn auch nur teilweise).

Diese Tatsache galt es in Bezug auf die Anwendbarkeit der SOP zur Serotypie von *E. coli*-Antigenen zu hinterfragen, um hierdurch eine Verbesserung der Routinediagnostik zu bewirken.

Wie die Testungen mit den kommerziellen Testseren ergaben, sind sie auch in einer bereits eingestellten Verdünnung durchaus geeignet, eine Serotypie von *E. coli*-O-Antigenen anhand einer Mikrotiterplattenmethode, wie in der SOP beschrieben, zu ermöglichen (Abschnitt 4.1.5.). Jedoch nicht bei allen verwendeten Isolaten aus Patientenmaterial erfolgte eine eindeutige Serovarbestimmung mit diesen Seren. Es ist von besonderer Bedeutung, dass bei ihrer Anwendung nach SOP, Referenz-Antigene als Positiv-Kontrollen eingesetzt werden (siehe Tabelle 12). Derartige Kontrollen stehen eigentlich nicht zur Verfügung, sodass Referenzstämme von der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, erworben werden müssen oder eindeutig charakterisierte Patientenisolat hierfür eingesetzt werden. Die Verwendung von serotypisch definierten fertig präparierten O- und H-Antigen-Bouillon als Referenz ist ebenso möglich. In unserem Labor konnten diese Antigene nach einer Lagerung von 6 Monaten identisch mit der Erstbestimmung nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt). Daher bestünde die Möglichkeit diese Referenzpräparate durch das NRZ für Interessenten abzugeben.

Die Optimierung der Serotypie der H-Antigene von *E. coli* beinhaltet zum Einen die Untersuchung der Flagellen-Expression nach Inkubation unter verschiedenen Temperaturbedingungen und zum Anderen unter aeroben und anaeroben

Inkubationsbedingungen. Die bisher verwendeten Anreicherungsmedien wurden als geeignet angesehen und nicht weiter variiert.

Publikationen von ANDRADE et al. (2002), FENG et al. (1996), LI et al. (1993), und RATINER (1999, 2003) bestätigten, dass die Expression von Flagellen durch äußere Einflüsse regulierbar ist. Für den serotypischen Nachweis kann eine derartige Stimulation von entscheidender Bedeutung sein, da nur ein korrekt ausgebildetes Antigen auch identifiziert werden kann. Deshalb erfolgte in dieser Arbeit die Erfassung der Motilität (beschrieben als „Swarming distance“, Abschnitt 4.2.2.) nach Inkubation bei 30°C, wie klassisch empfohlen, und nach Inkubation bei 37°C, aus Gründen der Rationalität (gleiche Temperatur wie für die Inkubation zur O-Antigen-Präparation), sowie nach Inkubation unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 30°C und 37°C. Insbesondere die als unbeweglich bekannten Serovare O143:H⁻, O144:H⁻, O164:H⁻ des Pathovars EIEC (enteroinvasive *E. coli*) und SFO157:H⁻ (SF = Sorbitol-fermentierend), O145:H⁻, O26:H⁻, O55:H⁻ des Pathovars EHEC wurden in die Untersuchungen einbezogen. Es konnte bei Stämmen aus Patientenmaterial, als auch bei Referenzstämmen gezeigt werden, dass sich die Inkubation bei 37°C auch für die Ausbildung der Flagellen als die geeignetste Temperatur darstellte (siehe Tabelle 20 und 21). Die anaeroben Bedingungen konnten in nur wenigen Fällen die Beweglichkeit stimulieren. Der serotypische Nachweis des H-Antigens verlief hierbei erfolgreich für die Serovare O91:H14, O26:H11 und O113:H4. Die unter anaeroben Bedingungen beweglichen SF O157-Isolate konnten nach Herstellung einer H-Antigen-Bouillon nach dem Standardverfahren nicht agglutiniert werden. Es gelang einzig der Nachweis aus der Direktkultur des U-Röhrchens mittels H7-Latex-Agglutinationstest („Wellcolex O157:H7-Latex Agglutination Kit“) bei einigen Stämmen (siehe Tabelle 22). Die Unbeweglichkeit von SF O157 wird durch ein Insertionselement im *fliC*-Gen hervorgerufen, die eigentlich nicht rekonstituierbar sein sollte (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). Weshalb der serologische Nachweis eines H7-Antigens möglich war, ist noch nicht geklärt worden.

Der Aufwand einer anaeroben Inkubation für die standardmäßige Typisierung der H-Antigene von *E. coli* rechtfertigt jedoch aus ökonomischer Sicht nicht den geringen Nutzen. Es wurde deshalb darauf verzichtet, diese Möglichkeit in die SOP zu integrieren. Vielmehr konnte dann ein Erfolg erzielt werden, wenn man unter den Standardbedingungen mehrere U-Röhrchen mit Einzelkolonien einsetzte. Für epidemiologische Zwecke, mit mehreren Isolaten besteht hierin eine kostengünstige Alternative (Abschnitt 4.2.2.).

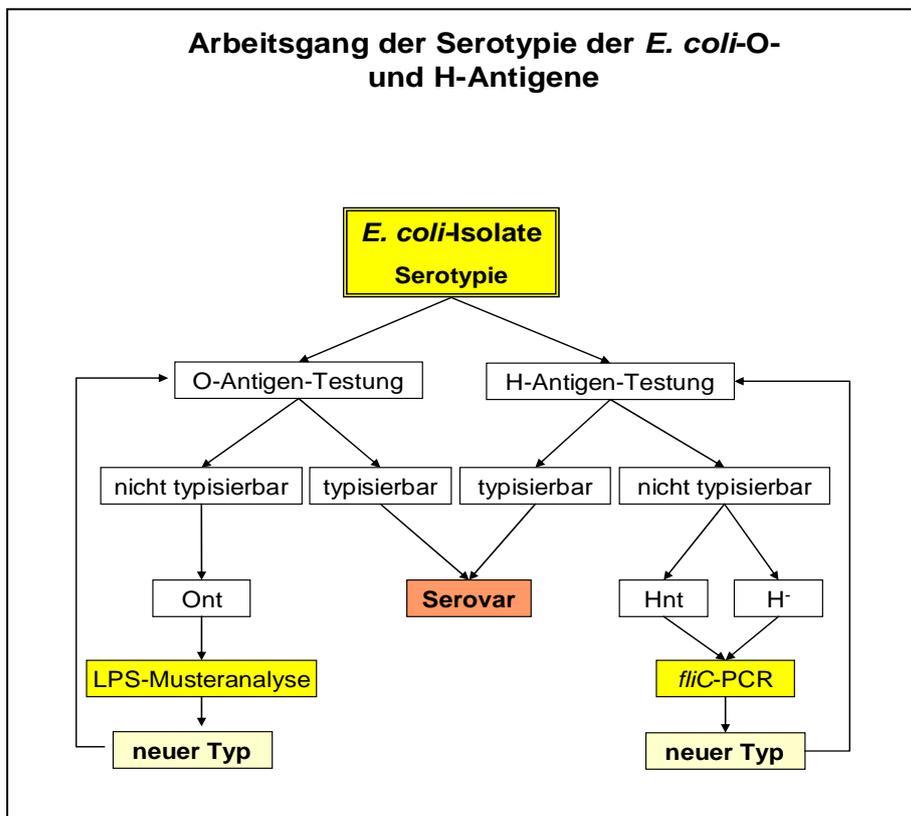
Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen konnte eine Optimierung der Methode zur Serotypie der O- und H-Antigene von *E. coli* erfolgen. Die Einzelschritte für die Bearbeitung

von *E. coli*-Isolaten wurden in einer SOP zusammengefasst (siehe Abschnitt 4.3, Abbildung 21). Die wesentliche Änderung besteht in der Anwendung eines Mikrotiterassays für beide Antigene, welcher nicht nur eine ökonomische Alternative zum herkömmlichen Verfahren darstellt, sondern auch die zeitgleiche Bewertung der kreuzreagierenden Komponenten ermöglicht. Hierdurch wird die Möglichkeit der Fehlinterpretation reduziert (siehe Abschnitt 4.1.4., Tabelle 10, Abbildung 9).

Durch Anwendung der erstellten SOP an Patientenmaterial konnte die Häufigkeit der Serovarverteilung in Deutschland ermittelt werden, insbesondere unter Berücksichtigung des Pathovars EHEC (siehe Abschnitt 4.4., Abbildung 22). Die Daten aus der Verfolgung dieser Häufigkeitsverteilung über einen längeren Zeitraum (1998-2004) dokumentierte, dass die Häufigkeitsverteilungen der Erreger variieren, aber einige Serovare dominant und in ihrem Anteil konstant bleiben. (siehe Abschnitt 4.4., Abbildung 23; Abschnitt 5.3.).

Die Vorgehensweise zur Durchführung der *E. coli*-Serotypie unter Einbeziehung der Überprüfung durch molekulare Methoden und der Erfassung neuer Serotypen soll die Abbildung 25 verdeutlichen (im Vergleich zu Abbildung 21).

Abbildung 25: Schema der Vorgehensweise bei der *E. coli*-Serotypie



5.1.2. Bedeutung der LPS-Muster für die Absicherung der Serotypie und die Beschreibung neuer Serovare von *E. coli*

Derzeit sind O-Antigene von 1-181 und H-Antigene von 1-56 beschrieben (ØRSKOV und ØRSKOV, 1984, SCHEUTZ et al., 2004). Ihre molekulare Analyse für die Vergleichbarkeit der Serotypie-Ergebnisse stand im Mittelpunkt der Arbeiten zur LPS-Musteranalyse mittels SDS-PAGE und der *fliC*-PCR. In dieser Arbeit wurden die neuen Antigene O187-192 hinzugefügt, die provisorisch bis zur Bestätigung durch das WHO-Zentrum für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, als OX187-OX192 bezeichnet werden (OX182-186 sind dort bereits in Bearbeitung, so dass diese Bezeichnungen gewählt wurden).

Mit beiden Methoden konnten erfolgreich Übereinstimmungen zwischen phänotypischen und molekularen Eigenschaften der Referenzstämme gefunden werden (siehe Abschnitt 4.1.6. und 4.2.5.). Es konnten Referenzmuster und entsprechende Datenbanken erstellt werden (Tabelle 13, Tabelle 23, Abbildung 19). Neben dem Vergleich mit bekannten Serovaren eröffneten sich hierbei Möglichkeiten zur Beschreibung neuer Serovare (siehe Abschnitt 4.1.6.8., Abschnitt 4.2.5.2).

In dieser Arbeit wurde erstmals im Zusammenhang mit einem standardisierten Serotypieverfahren die LPS-Musteranalyse zur Überprüfung der Serotypieergebnisse eingesetzt (siehe AUCKEN und PITT, 1993). Es konnten stabile, gut reproduzierbare Muster erzeugt werden (siehe Anhang 8-31). Die Reproduzierbarkeit zeigte sich sowohl innerhalb der Aufarbeitung der LPS-Präparationen, als auch für die angewendeten Elektrophoresebedingungen (siehe Abschnitt 4.1.6.5, Abbildungen 12 und 13). Durch die eingesetzte Auswerte-Software war die Ermittlung der Molekulargewichte von Einzelbanden innerhalb der Muster unter Einbeziehung von 2 Standard-LPS (*S.Tm* 618 und *E. coli* O92) möglich. Deren Molekulargewichte bildeten die Grundlage für die Berechnung der Molekulargewichte der RU, d.h. einer sich wiederholenden Einheit im LPS-Molekül. Bei der Technik der SDS-PAGE bindet Lipid A aus dem LPS-Molekül an SDS-Moleküle und dieser Komplex wandert im Gel entsprechend seinem Molekulargewicht. Da in einer LPS-Präparation O-spezifische Polysaccharide unterschiedlicher Kettenlängen enthalten sind, entsteht das abgebildete Bandenmuster (Abbildung 6, 7, Anhang 8-31). Durch die Aktivität der Polymerase wird immer eine komplette Einheit in das LPS-Molekül integriert. Deshalb reflektiert der Abstand zwischen zwei Banden im Gel die Größe einer RU. Es liegen LPS-Moleküle unterschiedlicher Kettenlängen gleichzeitig in der Zellwand vor, so dass Bandenmuster mit entsprechenden Molekulargewichtsgrößen abgebildet werden können

(SELTMANN und HOLST 2002), die analysiert wurden (Tabelle 13). Bereits AUCKEN et al. wiesen 1993 auf die Aussagekraft der LPS-Muster gramnegativer Bakterien hin. Sie beobachteten, dass speziell bei Ausbruchsuntersuchungen und serotypisch schwer zu erfassenden Spezies (*Ps. aeruginosa*, *S. marcescens*) über eine Darstellung des LPS-Profiles mit gleicher diskriminatorischer Bedeutung wie durch die Serotypie diese Isolate zugeordnet werden können.

Unter Verwendung von Isolaten aus Patientenmaterial konnten aus den RU-Werten Untersuchungen zur Stabilität innerhalb der Serovare durchgeführt werden (siehe Abschnitt 4.1.6.). Es wurden sehr gute Korrelationen mit den Serotypieergebnissen für die Mehrzahl der Serovare (z.B. O91, O103, O117, O26) ermittelt. Einige Variationen, wie das Auftreten von Doppelbanden, lassen eine eindeutige Einordnung des LPS-Muster zu dem entsprechenden Serovar zu. Andere Veränderungen des Musters innerhalb des Serovars können wiederum mit einer Korrelation zu bestimmten *E. coli*-Pathovaren auftreten (siehe Tabelle 15 und 16, Anhang 32).

Innerhalb des Serovars O157 publizierten CHART et al. (1993), sowie FUJIMOTO (1998) eine Heterogenität der LPS-Muster für O157-Stämme in Kombination mit verschiedenen H-Antigenen. Bei den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Analysen wurde ein anderes Ergebnis gefunden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Muster nicht abhängig vom H-Antigen abgebildet wurden. So ergaben die LPS-Muster der EPEC-Isolate O157:H45, O157:H16 identische RU-Werte (0,72 kDa), ebenso die der EHEC-Isolate von O157:H7, O157:H⁻, SFO157:H⁻ (0,69 kDa), und beide Cluster werden innerhalb der Schwankungsbreiten der Methode in die Gruppe „LPS O157“ eingeordnet (siehe Abschnitt 4.1.6.6.).

Trotzdem lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Größe der RU und der Serotyp eine gute Korrelation aufweist.

Der Prozess der Polymerisation und Ligation der O-Polysaccharide wird stark beeinflusst durch das Regulatorprotein Wzz. Fehlt dieses Protein, wird in der SDS-PAGE eine Bandenzahl von mehr als 30 Banden abgebildet. Für die Auswertung der Muster ist dieser Effekt von Vorteil. In der Abbildung von Isolaten aus Patientenmaterial kann die Regulation durch Wzz jedoch großen Einfluß auf die Auswertbarkeit der Gele haben, falls weniger als 5 Banden vorliegen. In den Analysen wurde dieser Effekt jedoch nur bei einigen Referenzstämmen beobachtet. Die Ergebnisse aus klinischen Stämmen (siehe Anhang 9-32) unterstrichen in ihrer Reproduzierbarkeit die Stabilität der Muster auch über lange Lagerungszeiträume und Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien hinweg.

Auf der Basis dieser Ergebnisse können auch bisher nicht definierte O-Antigene näher charakterisiert werden. Die Ermittlung des RU-Wertes und die Bewertung des Clusters innerhalb der Musterdatei der Referenzstämme für die bekannten O-Antigene erlauben aber eine Bewertung, ob fragliche Stämme bereits definierten oder neuen Typen zugeordnet werden sollen (HECKE, 2004). Die weitere Bearbeitung bis zur Definition eines neuen O-Typs erfolgt daran anschließend durch die detaillierte biochemische Charakterisierung und die Herstellung eines O-spezifischen Serums. Bei der Beschreibung der 6 neuen Serovare (Abschnitt 4.1.6.8.) wurde dabei von Gruppen mit mehreren Stämmen unterschiedlicher Herkunft ausgegangen, um relevante Merkmale herausarbeiten zu können. Für die Erstellung der Referenzstammsammlung war diese Prämisse nicht gegeben. Hier sind Serovare enthalten, die als Einzelisolat definiert wurden und z.T. bisher nicht wieder isoliert und publiziert werden konnten. Der Serovar O180 zählt diesen seltenen Serovaren.

Die Stukturanalysen von den O-Antigenen der *E. coli* der Referenzstammsammlung liegen für etwa zwei Drittel der Stämme vor (siehe 5.2.1.). Dieses Verfahren erlaubt einen genaueren Einblick in die Vielfalt der Antigenstrukturen, ist aber kosten- und zeitaufwändig und gelingt nur in hoch spezialisierten Einrichtungen. Hierin ist ein weiterer Vorteil der LPS-Musteranalyse zu sehen. Sie lässt sich in gut ausgestatteten biochemischen Laboratorien problemlos durchführen. Ein Austausch von Abbildungen fertiger Gele mit einer Referenzdatei spezialisierter Labore (NRZ), z.B. als Tif-files wie in den Netzwerken für Pulsfeldgelelektrophoresen (z.B. SalmGene, PulseNet Europe), wäre für die Identifizierung von serotypisch nicht definierbaren Isolaten denkbar, ist aber auch für solche mit bekannten Serovaren von Bedeutung.

Die als Ersatz für die Serotypie ebenfalls verwendete *rfb* –RFLP war bislang nicht erfolgreich für das gesamte Spektrum der *E. coli*-Serovare einsetzbar (COIMBRA et al. 2000). Die charakteristischen Gene für die Enzyme welche an der O-Antigen-Synthese (O-spezifische Polysaccharide) beteiligt sind, die hoch-konservierte 39-bp große JUMPstart Sequenz (just upstream of many polysaccharide-associated gene starts), und das *gnd*-Gen (6-Phosphogluconat-Dehydrogenase) bilden zusammen die Grundlage für die PCR-Amplifikation zum Nachweis des O-Antigen-Clusters (HOBBS und REEVES, 1994).

Der anschließende Verdau des Amplifikats mit Endonucleasen (*MboII*, *HhaI*, *SauIIIa*) führt zu einem Restriktionsmuster (RFLP) welches spezifisch für die verschiedenen Serovare sein soll. Bisher wurde diese Methode erfolgreich für O157, O26, O111, O91 und O172 (HOBBS und REEVES, 1994, BASTIN und REEVES, 1995, BILGE et al., 1996, WANG et al., 1998, D'SOUZA et al., 2002, PERELLE et al., 2002, GUO et al., 2004), eingesetzt. Eine solche

molekulare O-Antigenbestimmung ist aber nur mit hohem technischen Aufwand möglich, wobei ca. 15% der Stämme durch gleiche Muster charakterisiert waren und neue Serovare aus nicht-typisierbaren Isolaten nicht beschrieben werden konnten (COIMBRA et al. 2000).

5.1.3. Bedeutung der *fliC*-PCR für die Absicherung der Serotypie und für die Beschreibung neuer Serovare von *E. coli*

Die für das Flagellin charakteristische Struktur wird durch das *fliC*-Gen determiniert (IINO et al, 1988). Arbeitsgruppen um FIELDS (1997) und MACHADO (2000) nutzten diese Eigenschaft, um eine Typisierung der Flagellen von *E. coli* analog der Serotypie vorzunehmen. Der Polymorphismus der H-Antigene sollte sich also DNA-Sequenz-basiert auch nachweisen lassen (PRAGER et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden (PRAGER et al., 2003), dass alle serotypisch als H-Antigen mittels Referenzstämmen von H1 –H56 definierten Typen mittels *fliC*-PCR in charakteristischen RFLP-Mustern einzuteilen waren (siehe Abschnitt 4.2.5.1., Abbildung 19, 20).

In unseren Analysen wurde darüber hinaus die Eignung für die Beschreibung neuer Flagellen-Antigene geprüft. Für die Einordnung von Isolaten unbeweglicher Stämme, bei denen somit serotypisch kein H-Antigen bestimmbar ist, konnte die Methode erfolgreich angewandt werden. Dadurch konnte die Bedeutung insbesondere für die Anwendung bei epidemiologischen Untersuchungen unterstrichen werden (PRAGER et al., 2003). Ein großer Vorteil liegt dabei im geringeren Zeitaufwand, da die Aufarbeitung der Stämme nicht die Prüfung auf Beweglichkeit und die Ausbildung kompletter Flagellen voraussetzt.

Auch zeigten die *fliC*- RFLP-Muster, dass man neue H-Antigene definieren kann (siehe analog zu den O-Antigenen). Diese konnten im Wesentlichen dem Pathovar EIEC zugeordnet werden. Isolate dieses Pathovars sind hinsichtlich ihrer Ausbildung von Flagellen von mehreren Arbeitsgruppen bearbeitet worden (LI et al., 1993, GIRON et al., 2002, WANG et al., 2003). Es sind in einigen Fällen, z.B. bei Anzucht der Bakterien unter anaeroben Bedingungen, Nachweise von Flagellin-Proteinen gelungen. Jedoch ist die Ausbildung des kompletten Flagellen-Apparats nicht möglich. Dieser komplexe Prozess wird vermutlich hauptsächlich auf der Regulationsebene beeinflusst, da das *fliC*-Gen intakt nachweisbar ist. Bereits GIRON et al. (1995) und LEHMACHER (persönliche Mitteilung, 2002) typisierten *fliC*, sowie weitere Gene des Clusters, von EIEC-Isolaten, Shigella-Spezies und EHEC O157:H⁻ (SF vs NSF). Ihre Untersuchungen zeigten, dass Punktmutationen innerhalb des

fliC-Gens zu dramatischen Veränderungen auf Aminosäureebene führen und damit eine Strukturveränderung des Flagellenfilaments erzeugt, die zum Einen den Einbau in den Flagellenapparat verhindert und zum Anderen Epitope für eine serotypische Identifizierung maskiert. Mutationen im Regulator *flg* bewirken hingegen eine Verhinderung der Flagellin-Bildung oder die Produktion von identischem Protein in geringer Konzentration auf Alternativwegen, z.B. durch Aktivierung des allgemeinen Regulators HNS, was für Beweglichkeit und serotypische Identifizierung nicht ausreicht.

Durch die *fliC*-PCR gelingt die Typisierung nicht beweglicher *E. coli*-Stämme ebenso wie die Definition serotypisch nicht einzuordnender Stämme (Hnt). Die Vielzahl der neuen Varianten (H-Typen 57-69, Abschnitt 4.2.5.2.), verdeutlicht den Polymorphismus von *fliC* bei *E. coli* der noch weitere Untersuchungen erfordert, um das große Spektrum der H-Antigene zu erfassen.

5.2. Molekulare Grundlagen der Serotypie

Für der Analyse der serotypischen Ergebnisse hinsichtlich ihrer Übereinstimmung mit den molekularen Grundlagen, sowie die Beschreibung neuer *E. coli*-Serovare ist die Betrachtung der Struktur der jeweiligen Antigene von Bedeutung.

5.2.1. Polysaccharidstruktur und Serotypie

Das Molekulargewicht einer Repeating unit (RU) wird durch seine Zusammensetzung aus verschiedenen Polysacchariden bestimmt. Die Anzahl der enthaltenen Polysaccharide beträgt für die derzeit bekannten Strukturen 2 bis 6.

Einige wenige Serovare integrieren Aminosäuren in die RU (z.B. L-Ser in RU von *E. coli* O114), was für die Größe des Molekulargewichts dementsprechend beeinflusst (KNIREL et al., 1994).

Bei der Struktur der RU wird zwischen 3 Gruppen O-spezifischer Polysaccharide unterschieden:

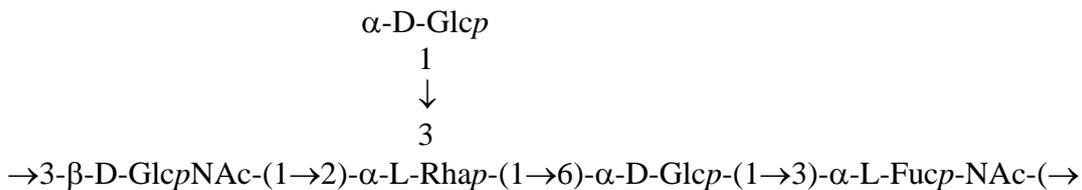
1. neutrale Homopolysaccharide, z.B.

O 8: $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow$

O 9: $\rightarrow 3\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow$
 $\dots 2)\text{-Manp}\text{-}(1\rightarrow$

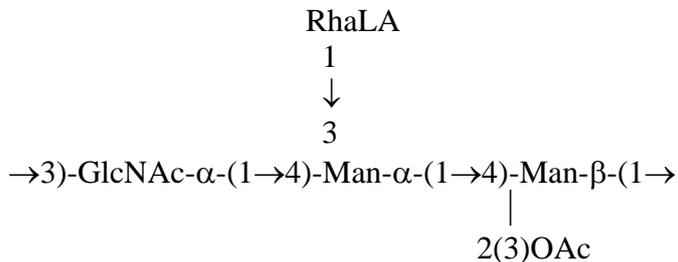
2. neutrale Heteropolysaccharide, z.B.

O 4:



3. saure Polysaccharide, z.B.

O 58:



Neutrale Polysaccharide überwiegen, saure Polysaccharide sind häufig die Basis für Kapsel-Polysaccharide (die in einigen Fällen auch identisch sein können, z.B. O104 und K9; JANSSEN, 1999).

In vielen Spezies sind identische Strukturen gefunden worden, was eine Vielzahl von serologischer Kreuzreaktionen hervorruft (z.B. Salmonella O30 und *E. coli* O157, Salmonella O62 und *E. coli* O35, Shigella dysenteriae O3 und *E. coli* O124) und deshalb eine eindeutige biochemische Charakterisierung erfordert, bevor eine Serotypisierung durchgeführt werden kann (siehe Hierarchie der Typisierungsmethoden, Abbildung 23).

5.2.2. Molekulare Grundlagen der nicht typisierbaren Stämme (O rau, Ont, Hnt)

Als Rau-Stämme bezeichnet man solche Stämme, die keine RU mehr ausbilden und nur noch die Core-Strukturen tragen. Sie entstehen auf verschiedenen Wegen aus einem ursprünglich komplett ausgestatteten Stamm. Ihre Bezeichnung rührt daher, dass sie in Gegenteil zu so genannten Glattstämmen als Kolonief orm auf festen Nährböden keine abgegrenzte runde glänzende Struktur besitzen, sondern gezackt und mit matter, eben „rauer“ Oberfläche wachsen.

In der Regel sind Mutationen im Komplex der *waa*-Gene dafür verantwortlich, wodurch genetisch unterschiedliche, aber phänotypisch sehr ähnliche Rau-Stämme vorliegen, z.B. die Polymerase arbeitet nicht mehr, einzelne Enzyme der Synthesekette für das LPS-Molekül fehlen, es werden die Core-Strukturen nur inkomplett gebildet, dadurch entstehen verschiedene Typen von tiefen Rauformen (z.B. Chemotyp Ra, Rb).

Beim Fehlen der Ligase entstehen Raustämme, die lange O-spezifische Polysaccharide akkumulieren. Sie sind gebunden an das Antigen Carrier Lipid (ACL).

Einige Raustämme erscheinen „glatt“, da durch die Kapsel-Polysaccharide die Funktion der O-Polysaccharide übernommen werden (z.B. bei *E. coli* O14).

Aus serotypischer Sicht (und der LPS-Musteranalyse) können alle diese Formen nicht typisiert werden. Es ist auch nicht möglich durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen bei der Stammanzucht diese Mutationen auszugleichen.

Vielfach lassen sich diese Stämme jedoch genetisch über die Analyse des *rfb*-Locus determinieren (FENG et al., 1998).

Andere Ont-Stämme stellen neue, bisher nicht bekannte O-Serotypen dar (siehe Abbildung 17, 18), die, wie hier für OX187-OX192 gezeigt wurde, in ihrer Klassifizierung noch offen sind. Auch für die H-Antigene sind nicht typisierbare Varianten noch häufig. Neben der Möglichkeit, dass neue bisher nicht erfasste H-Typen vorliegen, sind es besonders die nicht-mobilen Stämme, die eine Untypisierbarkeit bedingen.

Die Ausbildung der Flagelle ist somit von grundlegender Bedeutung für die Beweglichkeit. Ihre Synthese erfolgt kontinuierlich, aber langsam. Sie ist starken physiko-chemischen Belastungen ausgesetzt, kann abbrechen, und wird aber auch an der gleichen Stelle wieder regeneriert. Bei der Zellteilung entstehen zuerst Flagellen an den ältesten Polen und anschließend wird der volle Bestand gebildet.

Neben einer Reihe von Mutationen, insbesondere in den Genen *fliC*, *flgK*, *flmA*, können weitere Noxen die Flagellenbildung stören (wie Einwirkung von Antibiotika, anaerobe

Kulturbedingungen oder Anzucht durch Schüttelkultur) und die Ausbildung unvollständiger oder degenerierter H-Antigene bewirken (YETHON et al., 2000, 2001). Ihre Struktur kann von den Epitop-spezifischen Antikörpern der Testseren nicht erkannt werden und es erfolgt keine Agglutinationsreaktion im Serotypie-Test. Diese Auswirkungen lassen sich jedoch z.T. reversibel gestalten, im Gegensatz zu denen bei der O-Antigen-Bestimmung. Physikalische Belastungen können z.B. durch so genannte Standkultur minimiert werden.

In Publikationen von GIRON et al. (1995), FENG et al. (1996), ANDRADE et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass durch Stressfaktoren, wie Sauerstoffmangel, eine verstärkte Expression von Flagellen induziert wird. Insbesondere nicht-motile *E. coli*-Stämme des Pathovars EIEC zeigten unter diesen Bedingungen eine Beweglichkeit.

Hier ließ ein Nachweis des H-Antigens durch Anwendung von Latex-Agglutinationstests erbringen, z.B. für das H7-Antigen.

Auf molekularer Ebene ist die Bestimmung des *fliC*-Polymorphismus ein geeignetes Mittel eine Einordnung entsprechend der Serotypie vornehmen zu können (PRAGER et al. 2003). Diese Methode ist darüber hinaus geeignet, aus der Gruppe hinsichtlich des H-Antigens nicht typisierbarer Stämme neue H-Antigene zu beschreiben.

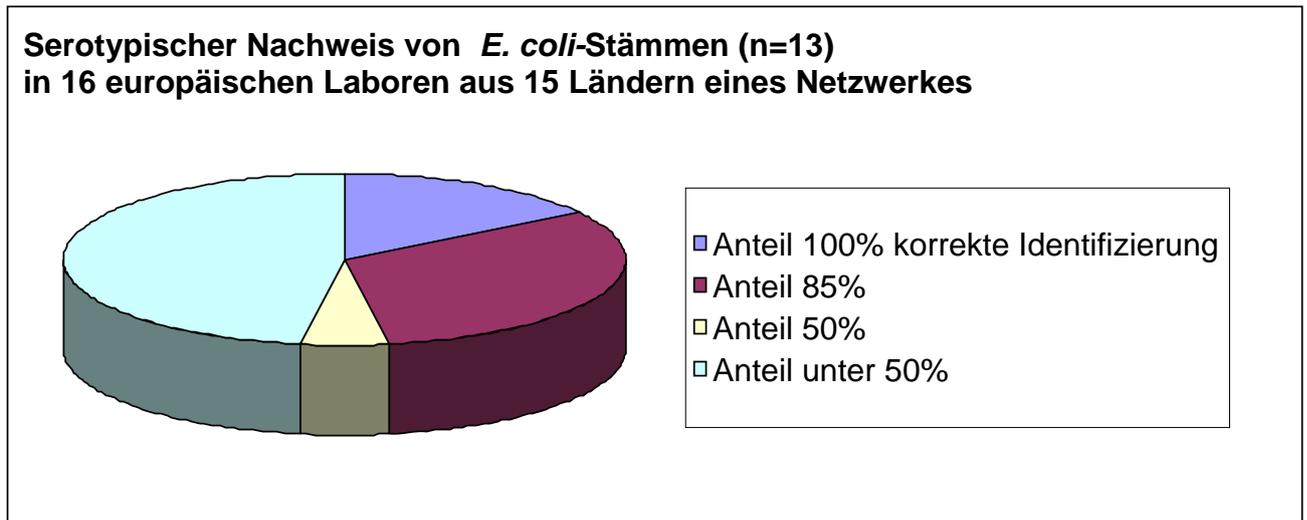
Eine DNA-Sequenzanalyse sollte darüber hinaus eine weitere Beurteilung dieser neuen Typen ermöglichen.

5.3. Epidemiologische Bedeutung der Serotypie

Für epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Häufigkeit der verschiedenen pathogenen *E. coli* ist die Serotypie ein unverzichtbares Instrument. Durch diese kostengünstige und unter einfachen Bedingungen durchführbare Methode können Analysen in vielfältiger Weise auch international vergleichbar ermöglicht werden (siehe SOP, Abbildung 21).

Die Grundlage hierfür ist jedoch eine einheitliche Methodologie, die eine Vergleichbarkeit erst gewährleistet. Die Prüfung einer Identität von Ergebnissen aus serotypischer Identifizierung von *E. coli*-Isolaten soll durch die WHO-Zentrale in Kopenhagen, DK, realisiert werden. Es konnte nach Durchführung von Ringversuchen in einem EU-Netzwerk (EnterNet) eindrucksvoll gezeigt werden, dass diese Grundlage nicht gegeben ist (siehe Abschnitt 4.3.).

Abbildung 26: Ringversuch zur *E. coli*-Serotypie 2002

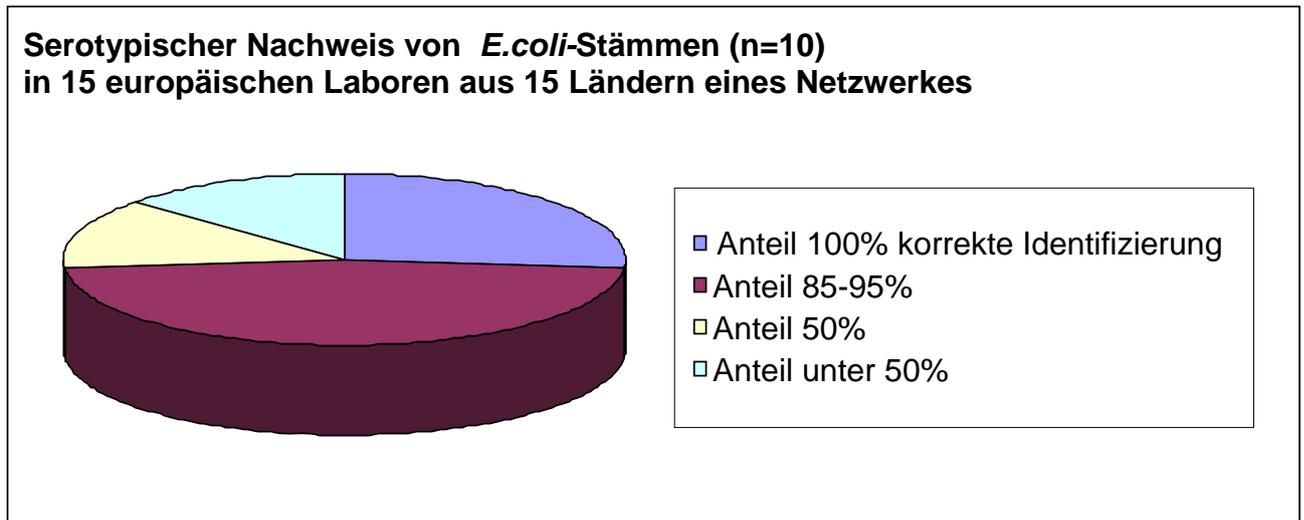


Wie in Abbildung 26 dokumentiert, waren im Jahr 2002 nur 2 Labore (von 16 Nationalen Referenzlaboren innerhalb der EU) in der Lage alle versandten 13 Stämme korrekt zu typisieren.

Eine, unter meiner Mitarbeit entstandene, SOP wurde im Anschluß an diesen Ringversuch implementiert, um zukünftige Typisierungen in derartigen Ringversuchen zu standardisieren. Der danach (2003) durchgeführte Versuch konnte eine erhebliche Verbesserung der Ergebnisse erbringen (Abbildung 27), denn die Identifizierung insbesondere der O-Serogruppen gelang in diesem Jahr in 75% aller teilnehmenden Labore.

Somit konnte gezeigt werden, dass nicht nur das Vorhandensein des kompletten Testserum-Sets für eine korrekte Typisierung entscheidend ist, sondern auch die Standardisierung der Serotypie-Methodik.

Abbildung 27: Ringversuch zur *E. coli*-Serotypie 2003



Auch wenn eine Einordnung von *E. coli*-Stämmen in Pathovaren durch Serotypie nicht mehr zeitgemäß ist, dient sie nach wie vor einer Vielzahl von Routinelaboren (und auch Referenzlaboren) als Methode zur näheren Charakterisierung der *E. coli*-Isolate .

Hierfür ist jedoch die konsequente Anwendung der SOP zu fordern. Wie auf internationaler Ebene gezeigt, ist auch auf nationaler Ebene durch die Anwendung der Objektträgeragglutination und die Aufarbeitung der *E. coli*-Präparationen von festen Nährmedien, eine korrekte Typisierung nur selten möglich.

Für das Erfassen der Vielfalt pathogener *E. coli* stellt die Serotypie jedoch die Grundlage dar, auf deren Basis weitere Analysen, wie PFGE, Lysotypie oder die Analyse der Ausstattung mit Virulenzfaktoren ermöglicht wird. Alle molekularen Methoden liefern bislang noch keinen ausreichenden Ersatz (siehe Abschnitt Ergebnisse 4.3.1.).

Im Rahmen der Untersuchungen mit Hilfe der Serotypie von *E. coli*-Isolaten aus klinischem Material konnte in dieser Arbeit die große biologische Vielfalt an Serovaren (O-Antigene, H-Antigene) pathogener *E. coli* erfasst werden. Bis vor 10 Jahren war davon ausgegangen worden, dass der Mehrzahl der beschriebenen Serovaren keine humanpathogene Bedeutung zuzumessen ist. Daher kann heute nur die Serotypie als epidemiologische Methode verstanden werden, allerdings hat sie auch eine quasi taxonomische Bedeutung. Aus den Daten der klinischen Stämme der Stammsammlung des NRZ ließ sich ermitteln, dass bis 2003 bereits 85% der bekannten *E. coli*- Serovaren allein dem Pathovar EHEC angehörten. Weitere 10% der Serovaren waren ETEC, EIEC, EAaggEC und ExPEC. Die Kenntnis des Serovars ist deshalb

für die Eingliederung in Pathovaren, besonders vor dem Hintergrund des horizontalen Gentransfers, von untergeordneter Bedeutung. Es muß vielmehr davon ausgegangen werden, dass jeder im Zusammenhang mit pathologischen Symptomen beim Menschen isolierter *E. coli* Virulenzfaktoren trägt, die diagnostiziert werden müssen, um eine Einordnung und Erfassung vornehmen zu können. Mittels der Ergebnisse der Serotypie werden damit epidemiologische Untersuchungen ermöglicht, und darüber hinaus Grundlagen für klonale Analysen geschaffen.

Wie in Abbildung 23 (siehe Abschnitt 4.4) illustriert, konnte gezeigt werden, dass der international am häufigsten vertretene Serotyp O157 in Deutschland ebenfalls der dominierende Serotyp ist. Von 1998 bis 2004 wurde er jedoch bei EHEC-Isolaten rückläufig in 23% auf 17% nachgewiesen. Der Serotyp O26 zeigte als zweithäufigster Typ die gleiche Tendenz in der Häufigkeitsverteilung. Nachdem er 2000 in 13% der Fälle nachweisbar war, betrug der Anteil 2003 noch 9%. Für die Serotypen O103 und O91 konnte ein Anstieg von 6% auf 10 bzw. 18% verzeichnet werden. Diese Tendenzen widerspiegeln die veränderte Situation in der Diagnostik von EHEC. Nachdem in den 80er und 90er Jahren vorrangig ein Screening auf *E. coli* O157 durchgeführt wurde, erfolgt seit Ende der 90er Jahre eine Erfassung und Isolierung auf der Grundlage der Shigatoxin-Bildung, unabhängig vom Serovar. Hierdurch kann das ganze Spektrum an Serovaren erfaßt werden. Die Häufigkeitsverteilung wird jedoch dadurch beeinflusst, dass durch die verhältnismäßig geringen Fallzahlen (ca. 1000 pro Jahr), Ausbruchsdaten in größerem Maße einfließen (z.B. familiäre Häufungen), als bei anderen Erregern (z. B. Salmonellen, Campylobacter). Insgesamt ergeben jedoch die Serovaren O157:H⁻/H7, O26:H⁻/H11, O103:H2 und O91:H⁻/H14/H21 zusammen die Hälfte der bisher in Deutschland auftretenden EHEC. Die andere Hälfte ist durch eine sich ständig erweiternde Gruppe von Serovaren gekennzeichnet. Insbesondere ein hoher Anteil seltener Serovaren (siehe Tabelle 28), sowie ein etwa 10% iger Anteil nicht-typisierbarer Serovaren erfordert die weitere Untersuchung und Überwachung dieses Pathovars.

Weitere *E. coli* –Pathovaren werden in Deutschland ebenso unzuverlässig erfasst. Obwohl die Meldedaten nach IfSG für andere intestinale Erreger (EPEC, ETEC, EIEC, EA_ggEC) in der Summe eine 4-fach höhere Inzidenz ergeben, sind die Daten der meistens nach Serovar gemeldeten Fälle nicht auswertbar. Nur solche Stämme für die eine Analyse der Virulenzfaktoren erfolgen, erfüllen die Falldefinitionen gemäß IfSG. Hier wären ähnliche Untersuchungen, wie für EHEC, von Bedeutung, um die Vielfalt analysieren zu können.

6. Schlußfolgerungen

1. Aus den vergleichenden Analysen für die Bedingungen zur Anzucht von *E. coli*-Bakterien, sowie für die Durchführung der serotypischen Identifizierung der O- und H-Antigene von *E. coli* wurde ein Verfahren optimiert und als Standard Operation Procedure (SOP) zusammengefasst.

Diese SOP wurde auf nationaler Ebene in der Routinediagnostik von Isolaten aus Patientenmaterial der Einsendungen an das NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger am Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, und international im Rahmen eines Workshops eingeführt, und anhand von EQA-Ringversuchen erprobt und angewendet. Mit diesem serologischen Verfahren lässt sich die biologische Vielfalt von O- und H-Antigenen gut erfassen.

2. Der Vergleich der Serotypie-Daten mit molekularen Ergebnissen erfolgte für die O-Antigen-Typisierung mittels der LPS-Musteranalyse (SDS-PAGE) und für die H-Antigen-Typisierung mittels *fliC*-PCR-RFLP und zeigte, dass eine Übereinstimmung existiert und bei Überlappung (z.B. kreuzreagierenden Antigenen) eine bessere Diskriminierung ermöglicht wurde.

Für beide Antigen-Typen ist eine Referenzmusterdatei mit den jeweiligen Referenzstämmen für die *E. coli*-Serotypie erstellt worden.

3. Die aus der LPS-Musteranalyse und *fliC*-PCR gewonnenen Daten unterstützten die Bewertung der Serotypie-Ergebnisse. Durch sie konnten Isolate im Vergleich mit der Musterdatei der Referenzstämmen für O- und H-Antigene zugeordnet und als „bekannt“ oder „neu“ klassifiziert werden.

4. Durch die LPS-Musteranalyse, als auch der *fliC*-PCR-RFLP kann über Musteraustausch (z.B. von tif-files der Gele) Information über *E. coli*-Stämme einer größeren Zahl von Laboren zugänglich gemacht werden, was insbesondere den Austausch von epidemiologischen Informationen vereinfachen würde.

5. Die molekularen Techniken können aber die serologische Charakterisierung der Vielfalt der O- und H-Antigene nicht ersetzen.

6. Mit Hilfe der standardisierten Serotypie von *E. coli* wurden mit 146 der bisher definierten 181 Serovare aus Einsendungen innerhalb der Bundesrepublik Deutschland an das NRZ für Salmonellen und andere Enteritiserreger bestimmt. Damit wurde eine große Vielfalt erfasst, die zu 93% pathogenen *E. coli* zugeordnet werden konnte (136 von 146).

Die Serovarverteilung ergab eine Häufung des Serovars O157 mit 17%, gefolgt von den Serovaren O26, O103 und O91 mit 9-14% (2003). Diese 4 Serotypen repräsentierten die Hälfte der in Deutschland auftretenden *E. coli*-Serovare. Die andere Hälfte war durch das Vorkommen von etwa 50 Serovaren charakterisiert.

Die Mehrzahl der typisierten Serovare ist dem Pathovar EHEC zuzuordnen. Die Diagnostik dieses Pathovars erfolgt in Deutschland durch die Bestimmung der Shigatoxin-Expression mittels ELISA oder mittels PCR-Nachweis der Shigatoxin-Gene.

Die Diagnostik anderer *E. coli*-Pathovare erfolgt aufgrund der Serovarzugehörigkeit mittels Serotypie zu bekannten Pathovar-Serovar-Korrelaten. Diese nicht mehr zeitgemäße Vorgehensweise ist jedoch in der Budgetierung bzw. Methodenfestlegung der Laborleistungen begründet.

7. Es wurden 6 neue Serotypen für die O-Antigene (OX187-OX192) definiert, welche durch Herstellung von Antiseren und durch entsprechende LPS-Muster charakterisiert wurden. Sie liegen zur Bestätigung als neue Typen in der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, vor.

Die H-Antigene wurden durch 13 neue Typen (H57 - H69) ergänzt. Diese sind nur über die *fliC*-PCR bestimmbar gewesen, da sie bei nicht-motilen Isolaten gefunden wurden, und solchen welche durch die unvollständige Flagellenausbildung gekennzeichnet waren. Sie stellen eine Serotypie-unabhängige Ergänzung insbesondere für epidemiologische Untersuchungen dar.

8. Die Methode der Serotypie stellt nach wie vor die Grundlage für die Surveillance von *E. coli*-Infektionen dar, und ist nicht zuletzt auch aus ökonomischen Gründen, von den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht abzulösen.

7. Literatur

- AMOR, K.; HEINRICHS, D.E.; FRIRDICH, E.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, R.P.; WHITFIELD, C. (2000): Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 68:1116-1124.
- ANDRADE, A.; GIRÓN, J.A.; AMHAZ, J.M.K.; TRABULSKI, L.R.; MARTINÉZ, M. (2002): Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. *Infect. Immun.* 70:5882-5886.
- AUCKEN, H.M.; PITT, T.L. (1993): Lipopolysaccharide profile typing as a technique for comparative typing of gram-negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 31:1286-1289.
- BASTIN, D.A.; REEVES, P.R. (1995): Sequence and analysis of the O antigen gene (*rfb*) cluster of *Escherichia coli* O111. *Gene*, 164:17-23.
- BETTELHEIM, K.A.; THOMPSON, C.J. (1987): New method for serotyping *Escherichia coli*: implementation and verification. *J. Clin. Microbiol.*, 25:781-786.
- BILGE, S.S.; VARY, J.C.jr.; DOWELL, S.F.; TARR, P.I. (1996): Role of the *Escherichia coli* O157:H7 O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect. Immun.*, 64:4795-4801.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J.M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M.P.; DAHBI, G.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. (2003): Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 41:1351-1356.
- BOLLANG, D.M.; EDELSTEIN, S. J. (1991): Protein methods. A.J. Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.
- CHART, H.; SAID, B.; STOKES, N.; ROWE, B. (1993): Heterogeneity in expression of lipopolysaccharides by strains of *Escherichia coli* O157. *J. Infect.*, 27:237-241.
- COIMBRA, R.S.; GRIMONT, F.; LENORMAND, P.; BURGUIÈRE, P.; BEUTIN, L.; GRIMONT, P.A.D. (2000): Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (*rfb*-RFLP). *Res. Microbiol.*, 151:639-654.

- CURRIE, C.G.; POXTON, I.R. (1999): The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157:H7 and other non-O157 verotoxin-producing *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 24:57-62.
- DODSON, K.W.; JACOB-DUBUISSON, F.; STRIKER, R.T.; HULTGREN, S.J. (1997): Assembly of adhesive virulence-associated pili in gram-negative bacteria. In: Sussmann, M. (ed.): *Escherichia coli*. Mechanismen of virulence. Cambridge University Press, Cambridge, 213-236.
- D'SOUZA, J.M.; WANG, L.; REEVES, P. (2002): Sequence of the *Escherichia coli* O26 O antigen gene cluster and identification of O26 specific genes. *GENE*, 297:123-127.
- EWING, W.H. (1986): Edwards and Ewing's: Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed., Elsevier Science Inc., New York.
- FARMER, B. (1996): Procedure Manual. CDC Atlanta.
- FENG, P.; FIELDS, P.I.; SWAMINATHAN, B.; WHITTAM, T.S. (1996): Characterization of nonmotile variants of *Escherichia coli* O157 and other serotypes by using an anti-flagellin monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.*, 34:2856-2859.
- FENG, P.; SANDLIN, R.C.; PARK, C.H.; WILSON, R.A. (1998): Identification of a rough strain of *Escherichia coli* O157:H7 that produces no detectable O157 antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 36:2339-2341.
- FIELDS, P.I.; BLOM, K.H.; HUGHES, J.H.; HELSEL, L.O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. (1997): Molecular characterisation of the gene encoding H-antigen in *Escherichia coli* and development of PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1066-1070.
- FRIRDICH, E.; LINDNER, B.; HOLST, O.; WHITFIELD, C. (2003): Overexpression of the *waaZ* gene leads to modification of the structure of the inner core region of *Escherichia coli* lipopolysaccharide, truncation of the outer core, and the reduction of the amount of O polysaccharide on the cell surface. *J. Bacteriol.*, 185:1659-1671.
- FRUTH, A.; RICHTER, H.; TIMM, M.; STRECKEL, W.; KLIE, H.; PRAGER, R.; REISSBRODT, R.; GALLIEN, P.; SKIEBE, E.; RIENÄCKER, I.; KARCH, H.; BOCKEMÜHL, J.; PERLBERG, K.W.; TSCHÄPE, H. (2000): Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). *BGBl.*, 4:310-317.

- FUJIMOTO, S.; MENO, Y.; HORIKAWA, K. (1998): Heterogeneity in expression of lipopolysaccharide and major outer-membrane proteins by strains of *Escherichia coli* O157 with different H-serotypes. *Microbiol. Immunol.*, 42:527-531.
- GAMIAN, A.; KENN, L.; MIESZALA, M.; ULRICH, J.; DEFAYE, J. (1994): Structure of the *E. coli* O24 and O56 O-specific sialic-acid-containing polysaccharides and linkage of these structure to the core region in lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 225:1211-1220.
- GIRALDI, R.; GUTH, B.E.C.; TRABULSI, L.R. (1990): Production of shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in Sao Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 28:1460-1462.
- GIRÓN, J.A. (1995): Expression of flagella and motility by *Shigella*. *Molecular Microbiology*, 18:63-75.
- GIRÓN, J.A.; TORRES, A.G.; FREER, E.; KAPER, J.B. (2002): The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, 44:361-379.
- GROZDANOV, L.; ZHRINGER, U.; BLUM-OEHLER, G.; BRADE, L.; HENNE, A.; KNIREL, Y.A.; SCHOMBEL, U.; SCHULZE, J.; SONNENBORN, U.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; RIETSCHEL, E.T.; DOBRINDT, U. (2002): A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.*, 184:5912-5925.
- GUINÉE, P.A.M.; AGTERBERG, C.M.; JANSEN, W.H. (1972): *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. *Applied Microbiology*, 24:127-131.
- GUO, H.; FENG, L.; TAO, J.; ZHANG, C.; WANG, L. (2004): Identification of *Escherichia coli* O172 O-antigen gene cluster and development of a serogroup-specific PCR assay. *J. Appl. Microbiol.*, 97:181-190.
- GUPTA, D.S.; SHASHKOV, A.S.; JANN, B.; JANN, K. (1992): Structures of the O1B and O1C Lipopolysaccharide Antigens of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 124:7963-7970.
- HACKER, J.; HEESEMANN, J. [Hrsg.] (2000): *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.

- HANCOCK, R.E.W.; KARUNARATNE, D.N.; BERNEGGER-EGLI, C. (1994): Molecular organization and structural role of outer membrane macromolecules. In: Ghuyssen, J.M.; Hakenbeck, R. (eds.). Bacterial cell wall. New comprehensive biochemistry, vol.27, Elsevier, Amsterdam, 263-279.
- HECKE, K. (2004): Charakterisierung von *Escherichia coli*-Isolaten des Serovars Ont:H- aus humanen Isolaten (der Sammlung des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger am Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode) mittels Analyse der LPS-Muster im SDS-Polyacrylamidgel. Diplomarbeit, FH Anhalt, Abteilung Köthen, FB Pharmazeutische Technik.
- HITCHCOCK, P.J.; BROWN, T. M. (1983): Morphological heterogenicity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. Bacteriol., 154:269-277.
- HOBBS, M.; REEVES, P.R. (1994): The JUMPstart sequence: a 39 bp element common to several polysaccharide gene clusters. Mol. Microbiol., 194:855-856.
- IINO, T.; KOMEDA, Y.; KITSUKAKE, K.; MACNAB, R.M.; MATSUMURA, P.; PARKINSON, J.S.; SIMON, M.I.; YAMAGUCHI, S. (1988): New unified nomenclature for the flagellar genes of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. Microbiol. Rev., 52:533-535.
- JANN, B.; JANN, K.; SCHMIDT, G.; ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. (1970): Immunological studies of polysaccharide surface antigens of *E. coli* O100:K?:H2. Eur. J. Biochem. 15:29-39.
- JANN, B.; SHASHKOV, A.S.; GUPTA, D.S.; JANN, K. (1992): The O18-antigens (lipopolysaccharide) of *E. coli*. Structural characterisation of the O18A, O18A1, O18B and O18B1-specific polysaccharides. Eur. J. Biochem. 210:241-248.
- JANN, B.; SHASHKOV, A.S.; TORGOV, V.; KOCHANOWSKI, H.; SELTMANN, G. (1995): NMR investigation of the deoxy-L-talose-containing O45 (O45-related) and O66 polysaccharides of *E. coli*. Carbohydr. Res. 278:155-165.
- JANSSON, P.E. (1999): The chemistry of O-polysaccharide chains in bacterial lipopolysaccharides. In: Brade, H.; Morrison, D.C.; Opal, S.; Vogel, S. [eds.]: Endotoxin in health and disease. Marcel Dekker, New York, 155-178.

- KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M. (2001): Sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 39:2043-2049.
- KAUFFMANN, F.; VAHLNE, G. (1945): Über die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 22:119-137.
- KEENLEYSIDE, W.J.; WHITFIELD, C. (1999): Genetics and biosynthesis of lipopolysaccharide O-antigens. In: Brade, H.; Morrison, D.C.; Opal, S.; Vogel, S. [eds.]: *Endotoxin in health and disease*. Marcel Dekker, New York, 331-358.
- KHAN, A.; NANDI, R.K.; DAS, S.C.; RAMAMUTTHY, T.; KHANAM, J.; SHIMIZU, T.; YAMASAKI, S.; BHATTACHARYA, S.K.; CHAICUMPA, W.; TAKEDA, Y.; BALAKRISHNAN, G. (2003): Environmental isolates of *Citrobacter braakii* that agglutinates with *Escherichia coli* O157 antiserum but do not possess the genes responsible for the biosynthesis of O157 somatic antigen. *Epidemiol. Infect.*, 130:179-186.
- KNIPSCHILD, H.E. (1945): *Undersøgelser over Coligruppens Serologi*. Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck, Copenhagen, 21-126.
- KNIREL, Y.A.; KOCHETKOV, N.K. (1994): The structure of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. III. The structure of O-antigens: A review. *Biochemistry (Moscow)*, 59, 12:1325-1383.
- KÖHLER, W.; SCHACHTEL, G.; VOLESKE, P. (1992): *Biostatistik*. 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. (1977): Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18: 775-779.
- LEVINE, M.M. (1987): *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Inf. Dis.*, 155:377-389.
- LI, C.; LOUISE, C.J.; SHI, W.; ADLER, J. (1993): Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 175:2229-2235.
- MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. (2000): Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene. *Res. Microbiol.*, 151:535-546.

- MACNAB, R.M. (1996): Flagella and motility. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhardt, F.C.; Curtiss, R., III; Ingraham, J.L.; Lin, E.C.C.; Low, K.B. Magasanik, B.; Reznikoff, W.S.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umberger, H.E. [Hrsg.], American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 123-145.
- MAMAT, U.; SEYDEL, U.; GRIMMECKE, D.; HOLST, O.; RIETSCHER, E.T. (1999): Lipopolysaccharides. In: Barton, D.; Nakanishi, K.; Meth-Cohn, O.; Pinto, B.M. (eds.). Comprehensive natural products chemistry, vol.3: carbohydrates and their derivatives including tannins, cellulose, and related lignins. Elsevier, Oxford, 179-239.
- MARSDEN, B.J.; BUNDLE, D.R.; PERRY, M.B. (1994): Serological and structural relationships between *E. coli* O98 and *Yersinia enterocolitica* O:11,23 and O:11,24 lipopolysaccharide O-antigens. *Biochem. Cell. Biol.* 72:163-168.
- MEDINA, E.C.; WIDMALM, G.; WEINTRAUB, A.; VIAL, P.A.; LEVINE, M.M.; LINDBERG, A.A. (1994): Structural studies of the O-antigenic polysaccharides of *Escherichia coli* O3 and the enteroaggregative *Escherichia coli* strain 17-2. *Eur. J. Biochem.*, 224:191-196.
- NEIDHARDT, F.C.; CURTISS, R., III; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C.C.; LOW, K.B. MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. [Hrsg.]: *Escherichia coli* and *Salmonella*. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.
- ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. (1984): Serotyping of *Escherichia coli*. In: Methods in microbiology, Vol. 14 – Academic Press, London: 44-112.
- ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I., BETTELHEIM, K.A. (1987): *Escherichia coli* flagellar serotyping is reliable as it has always been! *Epidemol. Infect.*, 98:221-222.
- ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. (1992): *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J. Microbiol.*, 38:699-704.
- PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J.; FACH, P. (2002): Identification of the O-antigen biosynthesis genes of *Escherichia coli* O91 and development of a O91 PCR serotyping test. *J. Appl. Microbiol.*, 93:758-764.
- PRAGER, R.; STRUTZ, U.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H. (2003): Subtyping of pathogenic *E. coli* strains using flagellar (H)- antigens : serotyping vs *fliC*-polymorphism. *Int. J. Mol. Microbiol.*, 292:477-486.

- RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD, C. (2002): Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry, 71:635-700.
- RATINER, Y.A. (1991): Serotyping of *Escherichia coli* flagellar antigens. In: Stein, G.; Fünfstück, R. [Hrsg.]: Harnwegsinfektionen: Aktuelle Gesichtspunkte zur pathogenen Diagnostik und Therapie. II. Wissenschaftliches Symposium 30. August bis 1. September 1989. Jena pmi-Verlag, Frankfurt am Main, 47-51.
- RATINER, Y.A. (1998): New flagellin-specifying genes in some *Escherichia coli* strains. J. Bacteriol., 180:979-984.
- RATINER, Y.A. (1999): Temperature-dependent flagellar antigen phase variation in *Escherichia coli*. Res. Microbiol., 150:457-463.
- RATINER, Y.A.; SALMENLINNA, S.; EKLUND, M.; KESKIMÄKI, A. (2003): Serology and genetics of the flagellar antigen of *Escherichia coli* O157:H7a,7c. J. Clin. Microbiol., 41:1033-1040.
- REEVES, P. (1994): Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharides. In: Ghuysen, J.M.; Hakenbeck, R. (eds.). Bacterial cell wall. New comprehensive biochemistry, vol.27, Elsevier, Amsterdam, 281-317.
- REID, S.D.; SELANDER, R.K.; WHITTAM, T.S. (1999): Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 181:153-160.
- RICE, E.W.; SOWERS, E.; JOHNSON, C.H.; DUNNIGAN, M.E.; STROCKBINE, N.A.; EDBERG, S.C. (1992): Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*. J. Clin. Microbiol., 30:1315-1316.
- RIETSCHER, R.T.; WESTPHAL, O. (1999): Endotoxin: Historical Perspectives. In: Brade, H.; Morrison, D.C.; Opal, S.; Vogel, S. [eds.]: Endotoxin in health and disease. Marcel Dekker, New York, 1-30.
- ROBINS-BROWNE, R.M.; BORDUN, A.-M.; Tauschek, M.; BENNETT-WOOD, V.R.; RUSSELL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N.A.; BETTELHEIM, K.; FAIRLEY, C.K.; SINCLAIR, M.I.; HELLARD, M.E. (2004): *Escherichia coli* and community acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. Emerg. Infect. Dis., 10:1797-1805.
- SCHEUTZ, F.; CHEASTY, T.; WOODWARD, J.; SMITH, H.R. (2004): Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7 and six new *E. coli* O groups that

- include verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* , 112:569-584
- SCOTLAND, S.M.; WILSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; ROWE, B. (1992): Strains of *Escherichia coli* O157:H8 from human diarrhoea belong to attaching and effacing class of *E. coli*. *J. Clin. Pathol.* 45:1075-1078.
 - SELTMANN, G.; HOLST, O. (2002): The bacterial cell wall. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
 - SHIMADA, T.; KOSAKO, Y.; ISSHIKI, Y.; HISATSUNE, K. (1992): Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 possesses somatic (O) antigen identical with that of *Salmonella* O30-1. *Current Microbiol.*, 25:215-217.
 - SMITH, T.; ORCUTT, M.L. (1925): *J. exp. Med.*, 41, 89.
 - SONNENBORN, U.; GREINWALD, R. (1991): Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora unter besonderer Berücksichtigung von Physiologie und Funktion der normalen *Escherichia coli* Flora. 2nd ed., Schattauer, Stuttgart, Germany, 55-68.
 - STAAF, M.; WIDMALM, G.; WEINTRAUB, A.; NATARO, J.P. (1995): Structural elucidation of the O-antigenic polysaccharide from *Escherichia coli* O44:H18. *Eur. J. Biochem.*, 233:473-477.
 - STAAF, M.; URBINA, F.; WEINTRAUB, A.; WIDMALM, G. (1999): Structure elucidation of the O-antigenic polysaccharide from the enteroaggregative *Escherichia coli* strain 62D1. *Eur. J. Biochem.*, 262:49-55.
 - STAAF, M.; URBINA, F.; WEINTRAUB, A.; WIDMALM, G. (1999): Structural elucidation of the O-antigenic polysaccharides from *Escherichia coli* O21 and the enteroaggregative *Escherichia coli* strain 105. *Eur. J. Biochem.*, 266:241-245.
 - TSAI, C.M.; FRASCH, C.E. (1982): A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* , 119:115-119.
 - TSCHÄPE, H.; FRUTH, A. (2001): EHEC. In: Mühldorfer, I. and Schäfer, H. (eds.): Emerging pathogens. Karger Verlag, Zürich.
 - VAARA, M. (1999): Lipopolysaccharide and the permeability of the bacterial outer membrane. In: Brade, H.; Morrison, D.C.; Opal, S.; Vogel, S. [eds.]: Endotoxin in health and disease. Marcel Dekker, New York, 31-38.

- WANG, L.; CURD, H.; QU, W.; REEVES, P.R. (1998): Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-antigen gene cluster and identification of O111-specific genes. *J. Clin. Microbiol.*, 36:3182-3187.
- WANG, L.; ROTHEMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P.R. (2003): Species-Wide Variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J. Bacteriol.*, 185:2936-2943
- WEINTRAUB, A.; LEONTEIN, K.; WIDMALM G.; VIAL, P.A.; LEVINE, M.M.; LINDBERG, A.A. (1993): Structural studies of the O-antigenic polysaccharide of an enteroaggregative *Escherichia coli* strain. *Eur. J. Biochem.*, 213:859-864.
- WESTPHAL, O.; JANN, K. (1965): Bacterial lipopolysaccharides. In: Whisther, R. L. [Hrsg.]: *Methods in carbohydrate chemistry*. Vol.5, Academic Press, New York, 63.
- WESTPHAL, O.; JANN, K. (1991): Bacterial lipopolysaccharides. In: Whisther, R. L. [Hrsg.]: *Methods in carbohydrate chemistry*. Verlag Chemie , Weinheim, New York, 34-96.
- YETHON, J.A.; VINOGRADOV, E.; PERRY, M.B.; WHITEFIELD, C. (2000): Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waaG* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. *J. Bacteriol.*, 182:5620-5623.
- YETHON, J.A.; WHITEFIELD, C. (2001): Purification and characterization of *waaP* from *Escherichia coli*, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability. *J. Biol. Chem.*, 276:5498-5504.
- ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHHEL, T. (1999): Chemical structure of lipid A: recent advances in structural analysis of biologically active molecules. In: Brade, H.; Morrison, D.D.; Opal, S.; Vogel, S.(eds.). *Endotoxin in health and disease*. Marcel Dekker, New York, 93-114.
- ZHANG, W.-L.; BIELASZEWSKA, M.; BOCKEMÜHL, J.; SCHMIDT, H.; SCHEUTZ, F.; KARCH, H. (2000): Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. *J. Clin. Microbiol.* , 38:2989-2993.

Anhang

Anhang 1: Übersicht der verwendeten *E.coli*- Referenzstämme für die O-und H-Antigen-Serotypie der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK

| Original-Nr. | Referenz für Antigen | Serotyp |
|---------------------|-----------------------------|----------------|
| U5-41 | O1,H7 | O1:K1:H7 |
| U9-41 | O2,K1,H4 | O2:K1:H4 |
| U14-41 | O3,K2ab | O3:K2ab:H2 |
| K15(=HW33) | H31 | O3:K -:H31 |
| 781-55 | H44 | O3:K19:H44 |
| U4-41 | O4,H5 | O4:K3:H5 |
| U1-41 | O5,K4 | O5:K4:H4 |
| Bi7458-41 | O6 | O6:K2a:H1 |
| F8316-41 | K15,H16 | O6:K15:H16 |
| 2147-59 | H49 | O6:K13:H49 |
| Bi7509-41 | 07 | 07:K1:H- |
| G3404-41 | O8,K8 | O8:K8:H4 |
| Bi7575-41 | K25,H9 | O8:K25:H9 |
| H330b | H20 | O8:K49:H20 |
| U11a-44 | H21 | O8:K49:H21 |
| C218-70 | H51 | O8:K50:H51 |
| Bi316-42 | O9,K9;H12 | O9:K9:H12 |
| A18d | H19 | O9:K36:H19 |
| Bi8337 | O10,K5 | O10:K5:H4 |
| Bi623-42 | O11;K10;H10 | O11:K10:H10 |
| K181 | H33 | O11:Kne:H33 |
| C2187-69 | H52 | O11:Kne:H52 |
| Bi626-42 | O12 | O12:K5:H- |
| Su4321-41 | O13;K11;H11 | O13:K11:H11 |
| Su4411-41 | O14;K7 | O14:K7:H- |
| F7902-41 | O15;K14 | O15:K14:H4 |
| P12b | H17 | O15:K97:H17 |
| F1119-41 | O16 | O16:K1:H- |
| P4 | H48 | O16:Kne:H48 |

| Original-Nr. | Referenz für Antigen | Serotyp |
|---------------------|-----------------------------|----------------|
| K12a | O17 | O17:K16:H18 |
| F10018-41 | O18ab,H14 | O18ab:K-:H14 |
| D-M3219-54 | O18ac | O18ac:K5:H7 |
| F8188-41 | O19ab | O19ab:K-:H7 |
| P7a | O20,K17 | O20:K17:H- |
| E19a | O21,K20 | O21:K20:H- |
| E14a | O22 | O22:K13:H1 |
| E39a | O23,K18ab,H15 | O23:K18ab:H15 |
| E41a | O24 | O24:K+:H- |
| E47a | O25,K19 | O25:K19:H12 |
| H311b | O26 | O26:K-:H- |
| 5306-56 | H46 | O26:K86:H46 |
| F9884-41 | O27 | O27:K-:H- |
| K1a | O28ab | O28ab:K-:H- |
| Kattwijk | O28ac | O28ac:H- |
| Su4338-41 | O29 | O29:K-:H10 |
| P2a | O30 | O30:K-:H- |
| P6a | O32 | O32:K-:H19 |
| E40 | O33 | O33:K-:H- |
| H304 | O34 | O34:K-:H10 |
| E77a | O35 | O35:K-:H10 |
| H502a | O36 | O36:K-:H9 |
| H510c | O37 | O37:K-:H10 |
| F11621-41 | O38 | O38:K-:H26 |
| N157 (=HW32) | H30 | O38:Kne:H30 |
| H7 | O39 | O39:K-:H- |
| H316 | O40 | O40:K-:H4 |
| H710 | O41 | O41:K-:H40 |
| P11a | O42,H37 | O42:K-:H37 |
| Bi7455-41 | O43,H2 | O43:K-:H2 |
| H702c | O44 | O44:H18 |
| H61 | O45,K1 | O45:K1:H10 |
| P1c | O46 | O46:K-:H16 |

| Original-Nr. | Referenz für Antigen | Serotyp |
|---------------------|-----------------------------|----------------|
| U8-41 | O48 | O48:K-:H- |
| U12-41 | O49 | O49:K+:H12 |
| U18-41 | O50 | O50:K-:H4 |
| U19-41 | O51 | O51:K-:H24 |
| K72 | H24 | O51:K12:H24 |
| U20-41 | O52 | O52:K-:H10 |
| 4106-54 | H45 | O52:Kne:H45 |
| Bi7347-41 | O53,H3 | O53:K-:H3 |
| Su3972-41 | O54 | O54:K-:H2 |
| Su3912-41 | O55 | O55:H- |
| Su3684-41 | O56 | O56:K+:H- |
| F8198-41 | O57 | O57:K-:H- |
| F8962-41 | O58 | O58:K-:H27 |
| F9095-41 | O59 | O59:K-:H19 |
| F10167a-41 | O60 | O60:K-:H33 |
| F10167b-41 | O61 | O61:K-:H19 |
| F10524-41 | O62 | O62:K-:H30 |
| F10598-41 | O63 | O63:K-:H- |
| K6b | O64 | O64:K-:H- |
| K11a | O65 | O65:K-:H- |
| P1a | O66 | O66:K-:H25 |
| P7d | O68 | O68:K-:H4 |
| P9b | O69,H38 | O69:K-:H38 |
| P9c | O70,H42 | O70:K-:H42 |
| P10a | O71 | O71:K-:H12 |
| P12a | O73 | O73:K-:H31 |
| E3a | O74,H39 | O74:K-:H39 |
| E3b | O75;K95 | O75:K95:H5 |
| E2987-73 | H55 | O75:Kne:H55 |
| E5d | O76 | O76:K-:H8 |
| E10 | O77,K96 | O77:K96:H- |
| E38 | O78 | O78:H- |
| E49 | O79,H40 | O79:K-:H40 |

| Original-Nr. | Referenz für Antigen | Serotyp |
|---------------------|-----------------------------|----------------|
| E71 | O80 | O80:K-:H26 |
| H5 | O81,K97 | O81:K97:H- |
| H14 | O82 | O82:K-:H- |
| H17a | O83 | O83:K-:H31 |
| H19 | O84 | O84:K-:H21 |
| H23 | O85 | O85:K-:H1 |
| H35 | O86 | O86:K-:H- |
| 5017-53 | H36 | O86:H36 |
| 1755-58 | H47 | O86:Kne:H47 |
| H40 | O87 | O87:K-:H12 |
| H53 | O88 | O88:K-:H25 |
| H68 | O89 | O89:K-:H16 |
| H77 | O90 | O90:K-:H- |
| H307b | O91 | O91:K-:H- |
| H308a | O92 | O92:K-:H33 |
| H311a | O95 | O95:K+:H33 |
| H319 | O96 | O96:K-:H19 |
| H320a | O97 | O97:K-:H- |
| H501d | O98 | O98:K-:H8 |
| H504c | O99 | O99:K-:H33 |
| H509a | O100 | O100:K-:H2 |
| H510a | O101 | O101:K-:H33 |
| H511 | O102 | O102:K-:H40 |
| H515b | O103 | O103:K+:H8 |
| H519 | O104 | O104:K-:H12 |
| H520b | O105 | O105:K-:H8 |
| H521a | O106 | O106:K-:H33 |
| H705 | O107,K98 | O107:K98:H27 |
| H708b | O108 | O108:K-:H10 |
| H709c | O109 | O109:K-:H19 |
| H711c | O110 | O110:K-:H39 |
| Stoke W | O111 | O111:H- |
| 1411-50 | O112ab | O112ab:H18 |

| Original-Nr. | Referenz für Antigen | Serotyp |
|---------------------|-----------------------------|----------------|
| Guanabara (1685) | O112ac | O112ac:H- |
| 6182-50 | O113 | O113:H21 |
| 26w (=K10=HW34) | O114,H32 | O114:H32 |
| 27w | O115 | O115:K-:H18 |
| 28w | O116 | O116:K+:H10 |
| 30w | O117 | O117:K98:H4 |
| 31w | O118 | O118:K-:H- |
| 34w | O119 | O119:H27 |
| 35w | O120 | O120:K18a:H6 |
| 39w | O121 | O121:K-:H10 |
| 43w | O123 | O123:K-:H16 |
| Ew227 | O124 | O124:H30 |
| Canioni | O125ab | O125ab:H19 |
| Ew2129-54 | O125ac | O125ac:H6 |
| E611 | O126 | O126:H2 |
| 4932-53 | O127a | O127a:H- |
| Cigleris | O128ab | O128ab:H2 |
| 5564-64 (=C717-65) | O128ac | O128ac:K-:H12 |
| Seeliger 178-54 | O129 | O129:K-:H11 |
| Ew4866-53 | O130 | O130:K-:H9 |
| S239 (=HW27) | O131,H26 | O131:K-:H26 |
| N87 (=HW30) | O132,H28 | O132:K+:H28 |
| N282 (=HW31) | O133;H29 | O133:K-:H29 |
| 4370-53 | O134,H35 | O134:K-:H35 |
| Coli Pecs | O135 | O135:K-:H- |
| 1111-55 | O136 | O136:H- |
| RVC1787 | O137,H41 | O137:H41 |
| CDC62-57 | O138 | O138:H14 |
| CDC63-57 | O139 | O139:K12:H1 |
| SN3N1 | H56 | O139:K-:H56 |
| CDC149-51 | O140,H43 | O140:K-:H43 |
| RVC2907 | O141ac | O141ac:H4 |
| C771 | O142 | O142:H6 |

| Original-Nr. | Referenz für Antigen | Serotyp |
|---------------------|-----------------------------|----------------------|
| 4608-58 | O143 | O143:K-:H- |
| 1624-56 | O144 | O144:K-:H- |
| E1385(3) | O145 | O145:K-:H- |
| CDC2950-54 | O146 | O146:K-:H21 |
| D357 (=G1253,F4-) | O147 | O147:H19 |
| E519-66 | O148 | O148:K-:H28 |
| E480-68 | H53 | O148a:Kne:H53 |
| Abbotstown | O149 | O149:H10;F4ac |
| 1935 | O150;K93 | O150:K93:H6 |
| 880-67 | O151 | O151:K-:H10 |
| 1184-68 | O152 | O152:K-:H- |
| 14097 | O153 | O153:K-:H7 |
| E1541-68 | O154,K94 | O154:K94:H4 |
| E1529-68 | O155 | O155:K-:H9 |
| E1585-68 | O156 | O156:K-:H47 |
| A2 | O157 | O157:H19;F4ac |
| E1020-72 | O158 | O158:K-:H23 |
| E2476-71 | O159 | O159:K-:H20 |
| E110-69 | O160 | O160:K-:H34 |
| E223-69 | O161,H54 | O161:K-:H54 |
| 10B1/1 | O162 | O162:K-:H10 |
| SN3B/1 | O163 | O163:K-:H19 |
| 145/46 | O164 | O164:K-:H- |
| E78634 | O165 | O165:K-:H- |
| 3866-54 | O166 | O166:K-:H4 |
| E10702 | O167 | O167:K-:H5 |
| E10710 | O168 | O168:K-:H16 |
| 1792-54 | O169 | O169:K-:H8 |
| 745-54 | O170 | O170:K-:H1 |
| 198 | O171 | O171:K-:H2 |
| 3288-85 | O172 | O172:K-:H- |
| L119B-10 | O173 | O173:K-:H- |
| 2531-54 | O174 | O174:K-:H? (H13/H27) |

| Original-Nr. | Referenz für Antigen | Serotyp |
|---------------------|-----------------------------|----------------|
| 2533-54 | O175 | O175:K-:H28 |
| A20a | H6 | O2:K1:H6 |
| Su1242 | H1 | O2:K2ab:H1 |
| Ap32oc | H8 | O2:K-:H8 |
| E29518-83 | O176 | O176:H- |
| E40874 | O177 | O177:H25 |
| E54071-88 | O178 | O178:H7 |
| E43478 | O179 | O179:H8 |
| 86-381 | O180 | O180:H- |
| 921250 | O181 | O181:H49 |

Anhang 2: *E. coli*-Stämme aus Ringversuchen (EQA)

| RKI-Nr. | Original-Nr. | Serotyp |
|----------------|---------------------|----------------|
| 02-04531 | AA1 | O137:H6 |
| 02-04532 | BB2 | O9:H21 |
| 02-04533 | CC3 | O9:H11 |
| 02-04534 | DD4 | O26:H11 |
| 02-04535 | EE5 | O157:H16 |
| 02-04536 | FF6 | O113:H6 |
| 02-04537 | GG7 | O157:H16 |
| 02-04538 | HH8 | O55:H7 |
| 02-04539 | II9 | O157:H7 |
| 02-04540 | JJ10 | O121:H45 |
| 02-04541 | KK11 | O145:H34 |
| 02-04542 | LL12 | O103:H2 |
| 02-04543 | MM13 | O111:H19 |
| 03-02909 | AA/1 | O157:H7 |
| 03-02910 | BB/2 | O26:H11 |
| 03-02911 | CC/3 | O103:H2 |
| 03-02912 | DD/4 | O111:H8 |
| 03-02913 | EE/5 | O113:H21 |
| 03-02914 | FF/6 | OX177:H6 |
| 03-02915 | GG/7 | O55:H- |
| 03-02916 | HH/8 | O121:H19 |
| 03-02917 | II/9 | O145:H28 |
| 03-02918 | JJ/10 | O117:H7 |

Anhang 3: Klinische Stämme von *E. coli*- Infektionen aus der Stammsammlung des NRZ

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 96-08678 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 97-10581-1 | O91:H14 | SOP |
| 98-04015 | O8:H- | LPS-Muster |
| 98-04916 | O8:H- | LPS-Muster |
| 98-05298 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 98-05420 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 98-05478 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 98-07956 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 98-08447-1 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 98-08660 | Ont:H19 | LPS-Muster |
| 98-10037 | O103:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 98-10280 | O143:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 98-10281 | O144:H- | SOP, <i>fliC</i> -PCR |
| 98-10283 | O164:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 99-03111 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 99-03276 | O2:H4 | LPS-Muster |
| 99-03525 | O91:H- | LPS-Muster |
| 99-03703 | O91:H- | LPS-Muster |
| 99-04644 | O8:H- | LPS-Muster |
| 99-05164 | Ont:H28 | LPS-Muster |
| 99-05166 | O91:H- | LPS-Muster |
| 99-05170 | O91:H- | LPS-Muster |
| 99-05610 | O157:H- | LPS-Muster |
| 99-06298 | O2:H4 | LPS-Muster |
| 99-06301 | Ont:H28 | LPS-Muster |
| 99-06625 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 99-07346 | O157:H16 | LPS-Muster |
| 99-08255 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 99-08257-1 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 99-09247 | O91:H- | LPS-Muster |
| 99-09349 | Ont:H28 | LPS-Muster |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 99-09350 | Ont:H28 | LPS-Muster |
| 99-09438 | O91:H- | LPS-Muster |
| 99-09588 | O91:H- | LPS-Muster |
| 00-00712 | O125ab:H6 | SOP |
| 00-00723 | O119:H25 | SOP |
| 00-00766 | Ont:H2 | LPS-Muster |
| 00-00789 | O125ab:H6 | SOP |
| 00-00793 | O179:H8 | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-00795 | O8:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-00847 | Ont:H19 | LPS-Muster |
| 00-00848 | O126:H- | SOP, <i>fliC</i> -PCR |
| 00-00925 | O91:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-01119 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 00-01127 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 00-01128 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 00-01210 | O157:H7 | LPS-Muster |
| 00-01211 | O157:H7 | LPS-Muster |
| 00-01213 | O157:H7 | LPS-Muster |
| 00-01214 | O157:H7 | LPS-Muster |
| 00-01215 | O157:H7 | LPS-Muster |
| 00-01743 | O174:H8 | LPS-Muster |
| 00-02016 | O174:H8 | LPS-Muster |
| 00-02040 | O174:H8 | LPS-Muster |
| 00-02093 | O26:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-02118 | O174:H8 | LPS-Muster |
| 00-02119 | O174:H8 | LPS-Muster |
| 00-02348 | O174:H8 | LPS-Muster |
| 00-02619 | O15:H7/9 | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-02973 | O119:H2 | SOP |
| 00-03235 | O119:H25 | SOP |
| 00-03291 | O8:H- | LPS-Muster |
| 00-03360 | O76:H- | <i>fliC</i> -PCR |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 00-03365 | O2:H4 | LPS-Muster |
| 00-03447 | O145:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-03892 | O8:H- | LPS-Muster |
| 00-03917 | O8:H- | LPS-Muster |
| 00-03940 | O157:H7 | LPS-Muster |
| 00-04295 | O157:H7 | LPS-Muster |
| 00-04298 | O112:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-04447 | O91:Hnt | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-04745 | O164:H- | SOP |
| 00-04915 | O76:Hnt | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-05159-2 | O91:H8 | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-05336 | Ont:H2 | LPS-Muster |
| 00-05700 | O146:H21 | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-05871 | O88:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-06050 | O146:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-06066 | O100:H- | LPS-Muster |
| 00-06521 | O100:H- | LPS-Muster |
| 00-06600 | Ont:H28 | LPS-Muster |
| 00-06606 | Ont:H2 | LPS-Muster |
| 00-06608 | O100:H- | LPS-Muster |
| 00-06616 | O128:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-07096 | O100:H- | LPS-Muster |
| 00-07153 | O74:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-07558 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 00-07569 | O8:H- | LPS-Muster |
| 00-08712 | O15:Hnt | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-09211 | O179:H8 | <i>fliC</i> -PCR |
| 00-09899 | O157:H45 | LPS-Muster, SOP |
| 00-10153 | O157:H- | LPS-Muster |
| 00-10717-1 | Ont:H19 | LPS-Muster |
| 00-10717-2 | O8:H- | LPS-Muster |
| 00-10885 | O128ab:H2 | SOP |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------------|
| 01-00496 | O113:H4 | LPS-Muster, SOP |
| 01-00498 | O113:H4 | LPS-Muster, SOP |
| 01-00499 | O128ab:H2 | SOP |
| 01-00592 | O156:H7/9 | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-00964 | O1:H7 | LPS-Muster |
| 01-01006 | O113:H4 | LPS-Muster, SOP |
| 01-01175 | O25:H4 | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-01266 | O177:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-01376 | O128ab:H2 | SOP |
| 01-01854 | O91:H- | LPS-Muster |
| 01-01901 | O113:H4 | LPS-Muster, SOP |
| 01-01902 | O113:H4 | LPS-Muster, SOP |
| 01-01903 | O113:H4 | LPS-Muster, SOP |
| 01-01907 | O3:H- | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-01934 | O91:H- | LPS-Muster, SOP |
| 01-02304 | O181:H49 | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-02813 | O69:H17 | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-02914 | Ont:H2 | LPS-Muster |
| 01-03033 | O5:H- | SOP |
| 01-03043 | O15:H- | SOP |
| 01-03049 | O5:H- | LPS-Muster |
| 01-03482 | Ont:H19 | LPS-Muster |
| 01-03709 | Ont:H49 | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-03803 | O91:H- | LPS-Muster |
| 01-03804 | O156:Hnt | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-04253 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 01-04259 | O91:H14 | LPS-Muster, SOP |
| 01-04454 | O104:H7/9 | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-04459 | O91:H- | LPS-Muster |
| 01-04787 | O2:H4 | LPS-Muster, SOP |
| 01-04788 | O2:H4 | LPS-Muster, <i>fliC</i> -PCR |
| 01-04789 | O2:H4 | LPS-Muster |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------------|
| 01-05081 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 01-05084 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 01-05173 | Ont:H2 | LPS-Muster |
| 01-05562 | O91:H14 | LPS-Muster, SOP |
| 01-06158 | O91:H- | LPS-Muster |
| 01-06303 | O91:H- | LPS-Muster |
| 01-06348 | O157:H16 | LPS-Muster, SOP |
| 01-06400 | O91:H- | LPS-Muster, SOP |
| 01-06517 | O91:H- | LPS-Muster |
| 01-06911 | Ont:H2 | LPS-Muster |
| 01-07319 | O17:H18 | SOP |
| 01-07343 | O5:H- | LPS-Muster |
| 01-07345 | O113:H4 | LPS-Muster |
| 01-07348 | O5:H- | LPS-Muster |
| 01-08110 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 01-09057 | O15:H- | SOP |
| 01-09093 | O113:H4 | LPS-Muster |
| 01-09094 | O8:H- | LPS-Muster |
| 01-09096 | O25:H4 | SOP |
| 01-09102 | O68:H- | SOP |
| 01-09520 | O17:H18 | SOP |
| 01-09679 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 01-09700 | O113:H4 | LPS-Muster, <i>fliC</i> -PCR |
| 01-09937 | O15:H- | SOP |
| 01-09938 | O5:H- | SOP |
| 01-10227 | O26:H11 | LPS-Muster, SOP |
| 01-10455 | O26:H11 | LPS-Muster, SOP |
| 01-10700 | O8:H- | LPS-Muster |
| 01-10974 | O8:H- | LPS-Muster |
| 01-11013 | O1:H7 | LPS-Muster |
| 01-11014 | O1:H7 | LPS-Muster |
| 01-11015 | O1:H7 | LPS-Muster |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 01-11089 | O26:H11 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11458 | O26:H11 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11551 | O113:H4 | <i>fliC</i> -PCR |
| 01-11839 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 01-11898 | O26:H11 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11948 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11949 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11950 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11952 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11953 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11955 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11960 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-11962 | O117:H7 | LPS-Muster, SOP |
| 01-12336 | O26:H- | SOP |
| 01-12339 | O113:H4 | <i>fliC</i> -PCR |
| 02-00197 | Ont:H11 | LPS-Muster |
| 02-00380 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-00574 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 02-02109 | O146:H21 | LPS-Muster, SOP |
| 02-02117 | O145:H- | LPS-Muster, SOP |
| 02-02123 | O146:H21 | LPS-Muster, SOP |
| 02-02140 | O146:H28 | LPS-Muster, SOP |
| 02-02173 | O118:H16 | SOP |
| 02-02177 | O146:H21 | LPS-Muster, SOP |
| 02-02416 | O26:H- | SOP |
| 02-02540 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02793 | O146:H21 | LPS-Muster, SOP |
| 02-02913 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02936 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02939 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02941 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02956 | O6:H1 | LPS-Muster |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 02-02979 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02980 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02981 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02982 | O1:H7 | LPS-Muster |
| 02-02983 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02984 | O6:H1 | LPS-Muster |
| 02-02989 | O1:H7 | LPS-Muster |
| 02-02990 | O1:H7 | LPS-Muster |
| 02-02991 | O1:H7 | LPS-Muster |
| 02-03006 | O1:H- | LPS-Muster |
| 02-03007 | O1:H- | LPS-Muster |
| 02-03044 | O103:H2 | LPS-Muster, SOP |
| 02-03133 | O26:H- | SOP |
| 02-03624 | O103:H2 | LPS-Muster, SOP |
| 02-03702 | O103:H2 | LPS-Muster, SOP |
| 02-03709 | O103:H2 | LPS-Muster, SOP |
| 02-03736 | O103:H2 | LPS-Muster |
| 02-03742 | Ont:H2 | LPS-Muster |
| 02-03802 | O103:H2 | LPS-Muster, SOP |
| 02-03803 | O103:H2 | LPS-Muster, SOP |
| 02-03907 | O55:H34 | LPS-Muster |
| 02-04410 | O100:H- | LPS-Muster |
| 02-04539 | O157:H16 | LPS-Muster |
| 02-04804 | O55:H- | LPS-Muster |
| 02-05047 | O26:H- | SOP |
| 02-05051 | O26:H- | SOP |
| 02-05054 | O26:H- | SOP |
| 02-05057 | O26:H- | SOP |
| 02-05062 | O118:Hnt | SOP |
| 02-05313 | O26:H- | SOP |
| 02-05342 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 02-05967 | O26:H- | SOP |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 02-06082 | O157:H19 | LPS-Muster |
| 02-06726 | O26:H- | SOP |
| 02-07405 | O26:H- | SOP |
| 02-07577 | O26:H- | SOP |
| 02-09516 | O157:H45 | LPS-Muster, SOP |
| 02-10479 | O124:H- | SOP |
| 02-11515 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 02-11524 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 02-11534 | O100:H- | LPS-Muster |
| 03-00917 | O118:H8 | SOP |
| 03-01590 | O118:H16 | SOP |
| 03-01763 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 03-01764 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 03-02446 | O118:H- | SOP |
| 03-02447 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 03-02448 | O91:H21 | SOP |
| 03-02449 | O91:H21 | SOP |
| 03-02460 | O103:H2 | SOP |
| 03-02477 | O91:H- | SOP |
| 03-02478 | O145:H- | SOP |
| 03-02480 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 03-02501 | O103:H2 | SOP |
| 03-02506 | O145:H- | SOP |
| 03-02507 | O145:H25 | SOP |
| 03-02510-1 | O145:H- | SOP |
| 03-02519 | O100:H- | SOP |
| 03-02525 | O100:H- | SOP |
| 03-02527 | O100:H- | SOP |
| 03-02529 | O9:H- | SOP |
| 03-02558 | O103:H2 | SOP |
| 03-02592 | O103:H2 | SOP |
| 03-02593 | O103:H2 | SOP |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 03-02655-1 | O118:H16 | SOP |
| 03-02655-2 | O118:H16 | SOP |
| 03-02664 | O145:H- | SOP |
| 03-02669 | O145:H- | SOP |
| 03-02670 | O145:H- | SOP |
| 03-02672-1 | O118:H- | SOP |
| 03-02672-2 | O91:H- | SOP |
| 03-02801 | O103:H2 | SOP |
| 03-02815 | O91:H- | SOP |
| 03-02816 | O103:H2 | SOP |
| 03-02817 | O91:H14 | SOP |
| 03-02843 | O103:H2 | SOP |
| 03-02867 | O145:H- | SOP |
| 03-02868 | O145:H- | SOP |
| 03-02890 | O103:H2 | SOP |
| 03-02911 | O103:H2 | SOP |
| 03-02915 | O55:H- | SOP |
| 03-02920 | O23:H15 | SOP |
| 03-02951 | O91:H14 | SOP |
| 03-02956 | O103:H2 | SOP |
| 03-02989 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-02990 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-02991 | O115:H10 | SOP |
| 03-02997 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-03004 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-03005 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-03007 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-03010 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-03011 | O145:H- | LPS-Muster |
| 03-03235 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03236 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03237 | O111:H- | LPS-Muster |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 03-03238 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03239 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03240 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03243 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03244 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03245 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03246 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03247 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-03248 | O111:H- | LPS-Muster |
| 03-04841 | Ont:H18 | LPS-Muster |
| 03-04847 | SFO157:H- | SOP |
| 03-04880 | O8:H- | SOP |
| 03-05007 | O5:H- | SOP |
| 03-05415 | O26:H11 | SOP |
| 03-05539 | O77:H18 | SOP |
| 03-05592 | Ont:H8 | LPS-Muster |
| 03-05768 | O5:H- | SOP |
| 03-05928 | O55:H31 | LPS-Muster |
| 03-06306 | O23:H15 | SOP |
| 03-06312 | O127:H6 | SOP |
| 03-06367 | O76:H19 | SOP |
| 03-07930 | O26:H34 | <i>fliC</i> -PCR |
| 04-00104 | O78:H- | SOP |
| 04-00158 | O111:H- | SOP |
| 04-00459 | O55:Hnt | LPS-Muster |
| 04-00598 | O26:H- | SOP |
| 04-01019 | O76:H- | SOP |
| 04-01070 | O78:H- | SOP |
| 04-01072 | O111:H- | SOP |
| 04-01330 | O5:H- | SOP |
| 04-01664 | O76:H- | SOP |
| 04-01684 | O91:H- | SOP |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 04-01773 | O115:H- | SOP |
| 04-01819 | O91:H- | SOP |
| 04-01862 | O26:H- | SOP |
| 04-01959 | O128:H- | SOP |
| 04-01992 | O157:H- | SOP |
| 04-02064 | O118:H- | SOP |
| 04-02068 | O128:H- | SOP |
| 04-02246 | O146:H- | SOP |
| 04-02420 | O91:H- | SOP |
| 04-02496 | O26:H- | SOP |
| 04-04558 | O103:H2 | SOP |
| 04-04643-2 | O103:H2 | SOP |
| 04-04669 | O103:H2 | SOP |
| 04-04786 | O103:H2 | SOP |
| 04-04787 | O103:H2 | SOP |
| 04-04832 | O103:H2 | SOP |
| 04-04852 | O103:H2 | SOP |
| 04-04952 | O103:H2 | SOP |
| 04-05510 | O157:H- | SOP |
| 04-05552 | O157:H- | SOP |
| 04-05605 | O142:H- | SOP |
| 04-05739 | O145:H- | SOP |
| 04-05981 | O91:H- | SOP |
| 04-05984 | O55:H6 | LPS-Muster |
| 04-05995 | O91:H21 | SOP |
| 04-06003 | O91:H21 | SOP |
| 04-06056 | O91:H- | SOP |
| 04-06251 | O103:H2 | SOP |
| 04-06259 | O103:H2 | SOP |
| 04-06267 | O91:H14 | SOP |
| 04-06269 | O91:H14 | SOP |
| 04-06352 | O103:H2 | SOP |

| RKI-Nr. | Serovar | Verwendung für: |
|----------------|----------------|------------------------|
| 04-06356 | O55:H7 | LPS-Muster |
| 04-06433 | O55:H- | LPS-Muster |
| 04-06497 | O55:H7 | LPS-Muster |
| 04-06554 | O55:H6 | LPS-Muster |
| 04-06556 | O55:H6 | LPS-Muster |
| 04-06558 | O55:H6 | LPS-Muster |
| 04-06561 | O103:H2 | SOP |
| 04-06837 | O91:H- | SOP |
| 04-06889-1 | O91:H- | SOP |
| 04-06948 | O103:H2 | SOP |
| 04-06952 | O91:H21 | SOP |
| 04-06983 | O55:H7 | LPS-Muster |
| 04-07079 | O103:H2 | SOP |
| 04-07247 | O91:H- | SOP |
| 04-07248 | O91:H21 | SOP |
| 04-07302 | O91:Hnt | SOP |
| 04-07474 | O103:H2 | SOP |
| 04-07509 | O91:H- | SOP |
| 04-07771 | O103:H2 | SOP |
| 04-07841 | O91:H14 | SOP |
| 04-07852 | O103:H2 | SOP |
| 04-07956 | O91:H- | SOP |
| 04-08052 | O103:H2 | SOP |
| 04-08127 | O91:H14 | SOP |
| 04-08384 | O26:H34 | <i>fliC</i> -PCR |
| 04-08408 | O91:H- | SOP |
| 04-08564 | O91:H14 | SOP |
| 04-08566 | O91:H- | SOP |
| 04-08706 | O157:H48 | <i>fliC</i> -PCR |
| 04-08708 | O103:H2 | SOP |

Anhang 4: Rezepturen der verwendeten Medien

- **Nährmedien für die Anzucht und biochemische Charakterisierung**

Enterohämolysinagar (Heipha, D)

Zusammensetzung:

Columbia-Agar (Oxoid, GB) 38,00 g/l

CaCl₂ 1,11 g/l

pH 7,1 ± 0,1

Autoklavieren bei 121°C für 12 min.

Zusatz von: Hammelerythrozythen 30 ml

Novobiocin 0,01 g/l

Cefsoludin 0,006 g/l

Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar (Heipha, D)

Zusammensetzung:

Pepton 10,0 g/l

Eiweißhydrolysat 2,0 g/l

Hefeextrakt 5,0 g/l

NaCl 5,0 g/l

Ochsengalle 8,0 g/l

Natrium-thiosulfat 1,0 g/l

Bromthymolblau 0,12 g/l

Ammonium-Eisen(III)-Citrat 2,0 g/l

Harnstoff 1,0 g/l

Glycerol 20,0 ml

Chrysoidin 0,0125 g/l

Agar 15,0 g/l

pH 7,3 ± 0,2

Autoklavieren bei 121°C für 12 min.

- **Nährmedien für die Isolierung der O-Antigene**

• **Enterohämolysinagar ohne Antibiotika**

Columbia-Agar (Becton Dickinson and Company, USA) 42,5 g/l

CaCl₂ (Merck KgaA, D) 1,11 g/l

pH 7,2 ± 0,1

Autoklavieren bei 121°C für 12 min.

Nach dem Abkühlen auf 45-50°C Zusatz von 30 ml gewaschener Schaeferythrozyten.

• **Antigen-Bouillon**

Proteose Pepton (Oxoid, GB) 20 g/l

Glucose (Merck KgaA, D) 1 g/l

NaCl (Merck KgaA, D) 5 g/l

Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Merck KgaA, D) 2 g/l

Hefeextrakt (Oxoid, GB) 3 g/l

Fleischextrakt (Oxoid, GB) 3 g/l

pH 7,3 ± 0,1

Autoklavieren bei 121°C für 20 min.

• **PBS (= Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)**

NaCl 8,28 g/l

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 1,187 g/l

pH 7,2 – 7,4

• **Nähragar**

Nähragar (SIFIN GmbH, D) 35 g/l

pH 7,2 – 7,4

• **Azidlösung**

NaN₃ 100 g/l

- **Nährmedien für die Isolierung der H-Antigene**

• **Beweglichkeitsagar**

| | | |
|---|-----------------|--------|
| Proteose Pepton | (Oxoid, GB) | 20 g/l |
| Glucose | (Merck KgaA, D) | 1 g/l |
| NaCl | | 5 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | | 2 g/l |
| Hefeextrakt | (Oxoid, GB) | 3 g/l |
| Fleischextrakt | (Oxoid, GB) | 3 g/l |
| Agar | (Oxoid, GB) | 2 g/l |

pH 7,3 ± 0,1

Autoklavieren bei 121°C für 20 min.

• **PBS-Formalin**

| | | |
|---|--|-----------|
| NaCl | | 8,28 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | | 1,187 g/l |
| Formaldehyd (37%) | | 5 ml |

pH 7,2 – 7,4

- **Nährmedien und Chemikalien für die LPS-Präparation**

• **Nährbouillon**

| | | |
|----------------------|-------------|----------|
| Glucose Nährbouillon | (Oxoid, GB) | 28,5 g/l |
| Fleischextrakt | (Oxoid, GB) | 2,5 g/l |

pH 7,2

• **Trypticase Soy Agar**

| | | |
|---------------------|---------------------------------|----------|
| Trypticase Soy Agar | (Becton Dickinson and Co., USA) | 40,0 g/l |
|---------------------|---------------------------------|----------|

pH 7,2-7,4

Anhang 5 : Chemikalien und Puffer

| Chemikalien | Hersteller |
|--|-----------------------------------|
| Acrylamid-Fertiglösung | Carl Roth GmbH Co., D |
| APS (Ammoniumpersulfat) | Serva Feinbiochemie GmbH & Co., D |
| CBB R 250 (Coomassieblau) | Merck KgaA, D |
| Dinatriumhydrogenphosphat (x 2 H ₂ O) | Merck KgaA, D |
| Essigsäure | Merck KgaA, D |
| Ethanol | Merck KgaA, D |
| Formaldehyd | Sigma-Aldrich@Chemie GmbH, D |
| Glycerin (ca.87%) | Merck KgaA, D |
| Harnstoff | Merck KgaA, D |
| Methanol | Merck KgaA, D |
| Natriumcarbonat wasserfrei | Merck KgaA, D |
| Natriumchlorid wasserfrei | Merck KgaA, D |
| Perjodsäure | Merck KgaA, D |
| Proteinase K | Carl Roth GmbH Co., D |
| Roti®-Load 1 | Carl Roth GmbH Co., D |
| Rotiophorese®Gel 30 | Carl Roth GmbH Co., D |
| Rotiophorese®10xSDS-Page | Carl Roth GmbH Co., D |
| Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine-sodium-salt) | Serva Feinbiochemie GmbH & Co., D |
| Silbernitrat | Feinchemie K.-H. Kallies KG, D |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Ferak, D |
| TEMED (N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin) | Serva Feinbiochemie GmbH & Co., D |
| Tris (Tris(hydroxymethyl(-aminomethan) | Serva Feinbiochemie GmbH & Co., D |
| Lysoformin®3000 | Lysoform, D |
| Wofasteril (Peressigsäure) | Kesla Pharma, D |

Tris-Puffer: 10mM (1,21 g Tris ad 1l aqua bidest., pH 7,8)

Acrylamidlösung : Acrylamid 30%
Bisacrylamid 0,8 %

Obergelpuffer : 0,25 M Tris/HCl-Puffer pH 6,8

Trenngelpuffer : 0,75 M Tris/HCl-Puffer pH 8,8

APS-Lösung : 1% Ammoniumpersulfat

SDS-Lösung : 10% Natriumdodecylsulfat

Überschichtungspuffer : 20 ml aqua bidest.
20 ml Obergelpuffer
1 ml SDS-Lösung

Laufpuffer: 10fach konzentrierter Fertigpuffer für SDS-PAGE
(Rotiophorese®10xSDS-Page), 1:9 verdünnt

Auftragspuffer: Roti Load 1

Sarkosyl-Puffer: Tris 1,34 g/l
Sarkosyl 16,7 g/l
pH 7,6

Proteinase K-Zusatz: 2,5 mg Proteinase K /ml Auftragspuffer

Anhang 6: Bunte Reihe nach FARMER
(gramnegative, aerobe Bakterien, insbesondere *Enterobacteriaceae*):

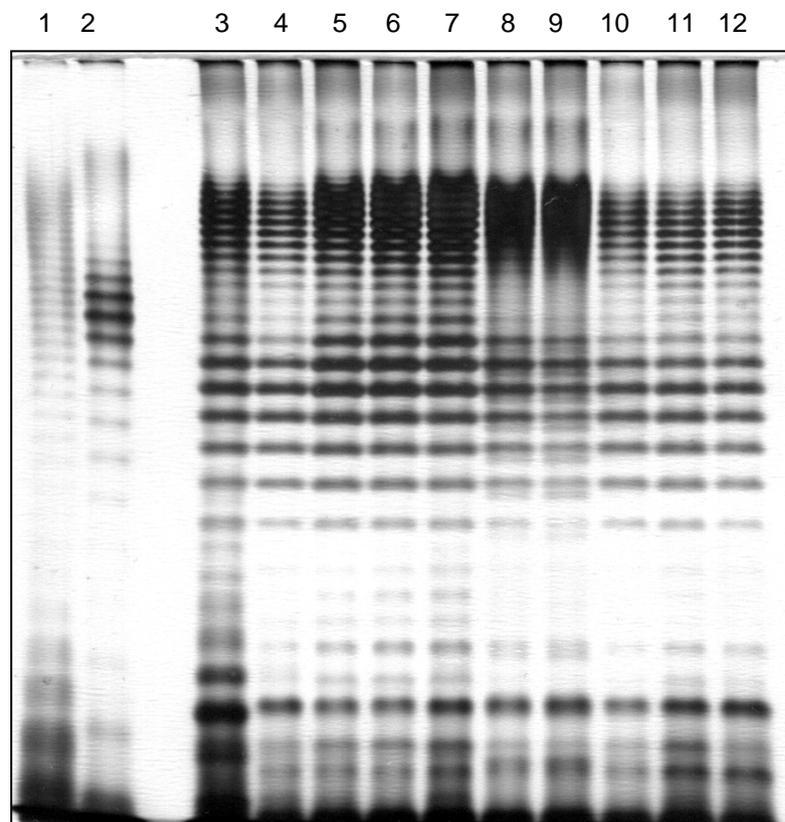
| Merkmal | Reaktion (Farbumschlag) |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Katalase | - |
| Kligler | Rot |
| Citrat, Simmons | Blau |
| Motilität | - |
| Indol | Rot |
| Lysin-Decarboxylase | Rot/Grau |
| Ornithin-Decarboxylase | Rot/Grau |
| Arginin-Decarboxylase | Rot/Grau |
| H ₂ S-Bildung, Gasbildung | Schwarz |
| Malonat-Verwertung | Blau |
| <i>Bildung von Säuren aus:</i> | |
| D-Adonitol | Rosa |
| Dulcitol | Rosa |
| Sorbitol | Rosa |
| Raffinose | Rosa |
| Arabinose | Rosa |
| Xylose | Rosa |
| Rhamnose | Rosa |
| Maltose | Rosa |
| Salicin | Rosa |
| i-Inositol | Rosa |
| Lactose | Rosa |
| Sucrose | Rosa |
| D-Mannitol | Rosa |
| D-Glucose | Rosa |
| Wachstum KCN | Trübung |
| Wachstum KNO ₃ | Rot |
| Voges Proskauer | Rot |
| Methylrot | Rot |
| Urease | Rot |

Anhang 7: Geräteliste

| |
|--|
| Sicherheitswerkbank: |
| Hera Safe, Typ HS12, Kendro Laboratory Products, D |
| |
| Schüttelinkubator: |
| Certomat®H (Heizelement), B. Braun, D |
| Sicherheitswerkbank: |
| Hera Safe, Typ HS12, Kendro Laboratory Products, D |
| Certomat®U (Schüttler), B. Braun, D |
| |
| Zentrifugen: |
| Labofuge 400, Kendro Laboratory Products, D |
| Beckman J2-HS (Rotor JA-20.1), Beckman, USA |
| Beckman Optima XL70, Beckman, USA |
| Beckman Optima L60 (Rotor 50TI), Beckman, USA |
| |
| Wasserbad: |
| 50l , GFL, D |
| Lauda Ecoline, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, D |
| Bad-/Umwälzthermostat E103, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, D |
| |
| Ultraschallgerät: |
| Branson Sonifier 450 (20kHz, 400W, 230V), Branson Ultrasonics, USA |
| Thermostat, STÖRK Tronic, D |
| |
| Ultraschallbad: |
| Bandelin SONOREX, Super RK 103H, Bandelin Electronic GmbH, D |
| |
| Inkubatoren: |
| Inkubationsschrank Typ B 6760, Kendro Laboratory Products, D |
| Inkubationsschrank Typ B 6060, Kendro Laboratory Products, D |
| |

| |
|---|
| Tiefkühlschrank: |
| Hera freeze HFU2585, Kendro Laboratory Products, D |
| |
| Thermomixer: |
| Eppendorf-Thermomixer 5436, Eppendorf, D |
| |
| Elektrophorese: |
| Kühlelement, STÖRK Tronic, D |
| Elektrophoresekammer, Biometra, D |
| Power Supply Bio Rad Model 1000/500, BioRad Laboratories, USA |
| |
| Wipptisch: |
| Kick II, Biometra, D |
| |
| Geltrockner: |
| BioRad Modell 583, BioRad Laboratories, USA |
| |
| Gelscanner: |
| Model GS-700 Imaging Densitometer, BioRad Laboratories, USA |
| |
| Gelauswertesoftware: |
| Quantity One Version 4.0, BioRad Laboratories, USA |
| Molecular Analyst fingerprinting Plus version 1.6, BioRad Laboratories, USA |
| |
| PC: |
| Fujitsu Siemens |

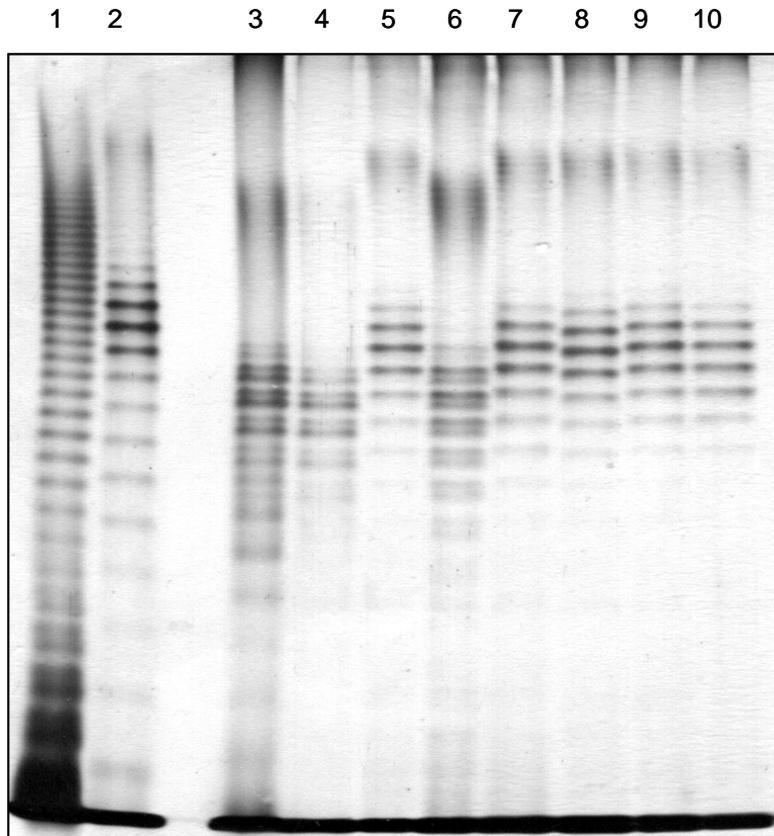
Anhang 8: LPS-Muster von *E. coli* O1-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte
(in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 01-00964 |
| 4 | 02-02982 |
| 5 | 02-02989 |
| 6 | 02-02990 |
| 7 | 02-02991 |
| 8 | 02-03006 |
| 9 | 02-03007 |
| 10 | 01-11013 |
| 11 | 01-11014 |
| 12 | 01-11015 |

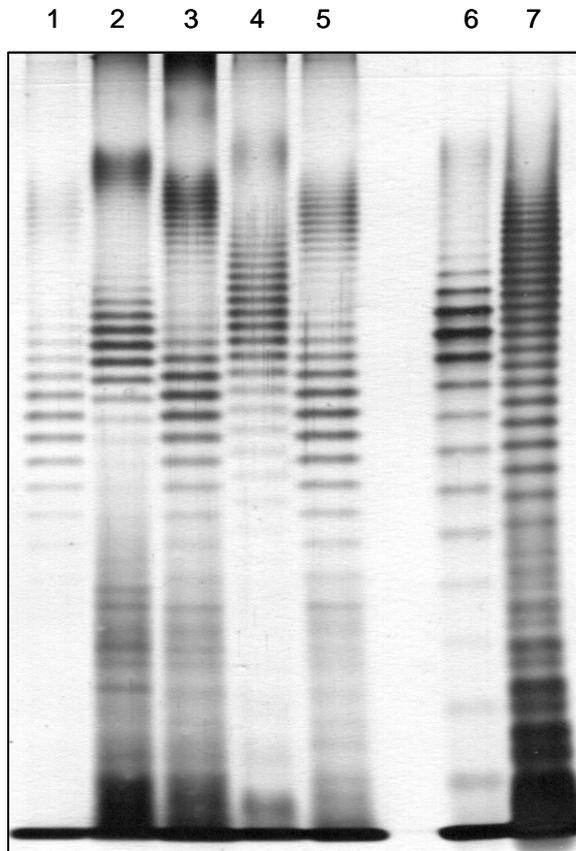
| Stamm | MW 1 | MW 2 | MW 3 | MW 4 | MW 5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 01-00964 | 28,00 | 26,81 | 25,61 | 24,34 | 22,95 | 1,26 |
| 02-02982 | 28,16 | 26,91 | 25,69 | 24,42 | 23,06 | 1,28 |
| 02-02989 | 27,87 | 26,69 | 25,49 | 24,24 | 22,90 | 1,24 |
| 02-02990 | 27,90 | 26,71 | 25,56 | 24,30 | 22,97 | 1,23 |
| 02-02991 | 27,88 | 26,69 | 25,53 | 24,27 | 22,93 | 1,24 |
| 02-03006 | 27,87 | 26,68 | 25,53 | 24,28 | 22,95 | 1,23 |
| 02-03007 | 27,67 | 26,50 | 25,37 | 24,13 | 22,82 | 1,21 |
| 01-11013 | 27,95 | 26,75 | 25,55 | 24,31 | 22,98 | 1,24 |
| 01-11014 | 27,86 | 26,66 | 25,43 | 24,19 | 22,87 | 1,25 |
| 01-11015 | 28,16 | 26,89 | 25,68 | 24,38 | 23,05 | 1,28 |
| | | | | | | 1,25 |

Anhang 9: LPS-Muster von *E. coli* O2-Stämmen



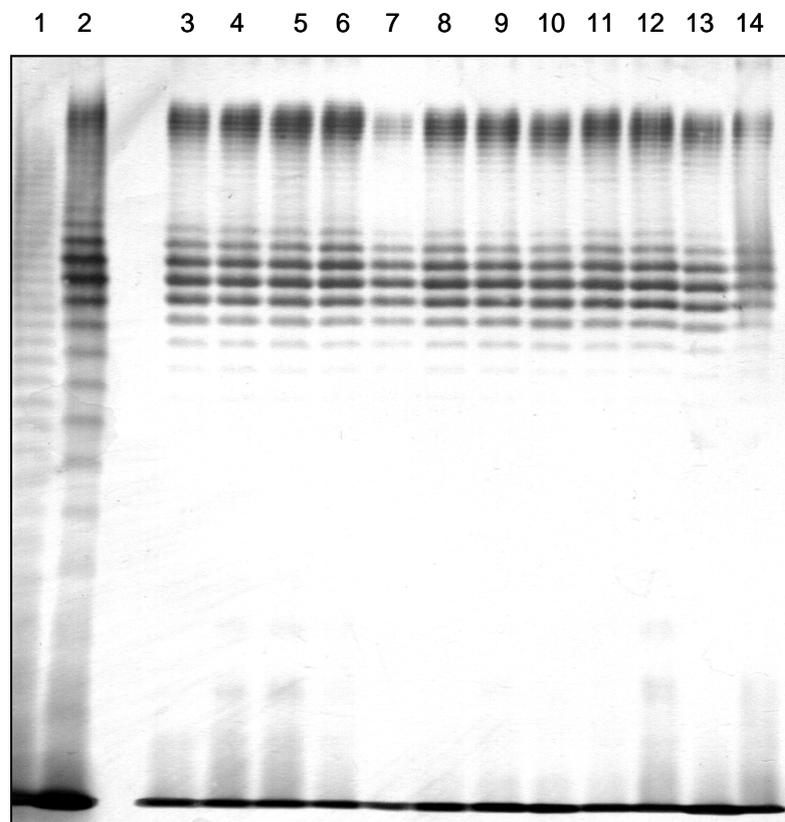
| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | O2 Sed., 100 °C |
| 4 | O2:K1 |
| 5 | O1-04789 |
| 6 | O1-04788 |
| 7 | O1-04787 |
| 8 | O0-03365 |
| 9 | 99-06298 |
| 10 | 99-03276 |

Anhang 10: LPS-Muster von *E. coli* O5-Stämmen



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | O5:H4 (1) |
| 2 | 01-07343 |
| 3 | 01-07348 |
| 4 | 01-03049 |
| 5 | O5:H4 |
| 6 | <i>E. coli</i> O92 |
| 7 | <i>S. Typhimurium</i> LT2 |

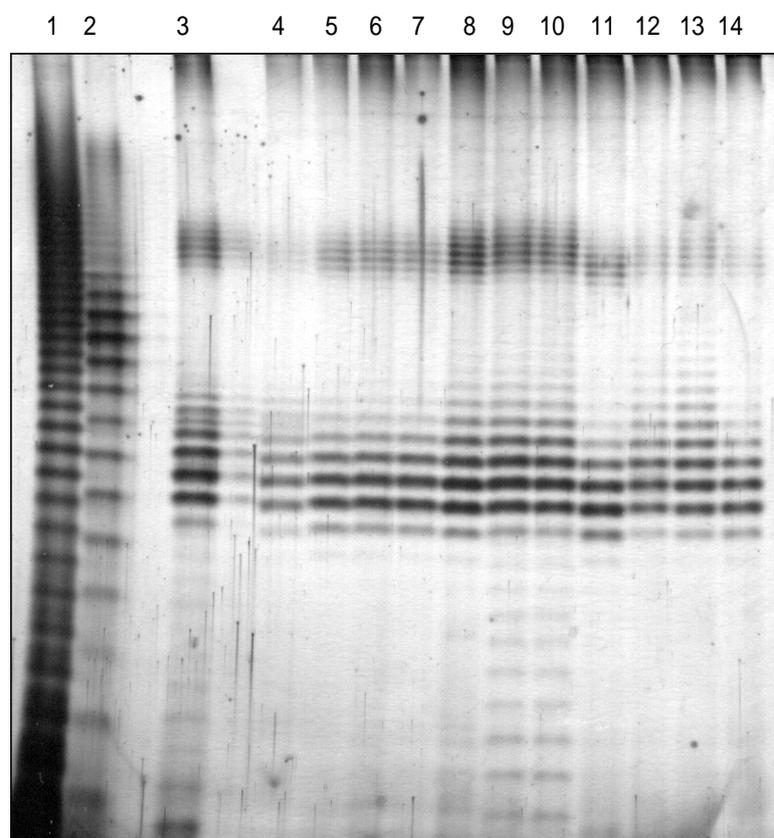
Anhang 11: LPS-Muster von *E. coli* O6-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 02-00380 |
| 4 | 02-02913 |
| 5 | 02-02936 |
| 6 | 02-02939 |
| 7 | 02-02941 |
| 8 | 02-02956 |
| 9 | 02-02979 |
| 10 | 02-02980 |
| 11 | 02-02981 |
| 12 | 02-02983 |
| 13 | 02-02984 |
| 14 | 02-02540 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 02-00380 | 30,94 | 29,75 | 28,65 | 27,64 | 26,62 | 1,08 |
| 02-02913 | 30,96 | 29,84 | 28,75 | 27,74 | 26,76 | 1,05 |
| 02-02936 | 31,00 | 29,89 | 28,80 | 27,80 | 26,81 | 1,05 |
| 02-02939 | 31,20 | 30,09 | 29,00 | 28,05 | 27,01 | 1,05 |
| 02-02941 | 31,41 | 30,30 | 29,25 | 28,25 | 27,21 | 1,05 |
| 02-02956 | 31,35 | 30,25 | 29,22 | 28,23 | 27,18 | 1,04 |
| 02-02979 | 31,17 | 30,15 | 29,09 | 28,12 | 27,12 | 1,01 |
| 02-02980 | 31,65 | 30,56 | 29,49 | 28,49 | 27,46 | 1,05 |
| 02-02981 | 31,78 | 30,68 | 29,60 | 28,59 | 27,56 | 1,06 |
| 02-02983 | 31,97 | 30,85 | 29,73 | 28,70 | 27,71 | 1,07 |
| 02-02994 | 31,86 | 30,79 | 29,71 | 28,68 | 27,67 | 1,05 |
| 02-02540 | 31,80 | 30,83 | 29,84 | 28,81 | 27,88 | 0,98 |
| | | | | | | 1,04 |

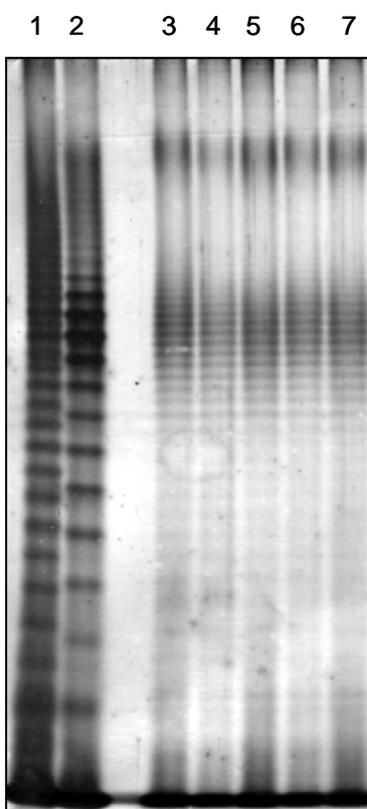
Anhang 12: LPS-Muster von *E. coli* O8-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|--------------------|
| 1 | S. Typhimurium LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | O8 Referenz |
| 4 | 98-04916 |
| 5 | 98-04015 |
| 6 | 99-04644 |
| 7 | 00-10717-2 |
| 8 | 00-07569 |
| 9 | 00-03917 |
| 10 | 00-03892 |
| 11 | 01-10974 |
| 12 | 01-10700 |
| 13 | 01-09094 |
| 14 | 00-03291 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| Ref.O8 | 24,74 | 24,10 | 23,43 | 22,74 | 22,09 | 0,66 |
| 98-04916 | 24,74 | 24,06 | 23,40 | 22,68 | 22,00 | 0,69 |
| 98-04015 | 24,82 | 24,14 | 23,46 | 22,77 | 22,09 | 0,68 |
| 99-04644 | 24,82 | 24,13 | 23,46 | 22,76 | 22,08 | 0,69 |
| 00-10717-1 | 24,77 | 24,07 | 23,41 | 22,72 | 22,03 | 0,69 |
| 00-07569 | 24,79 | 24,10 | 23,41 | 22,72 | 22,04 | 0,69 |
| 00-03917 | 24,75 | 24,06 | 23,40 | 22,72 | 22,06 | 0,67 |
| 00-03892 | 24,73 | 24,04 | 23,35 | 22,70 | 22,02 | 0,68 |
| 01-10974 | 24,76 | 24,07 | 23,38 | 22,70 | 22,01 | 0,69 |
| 01-10700 | 24,76 | 24,06 | 23,40 | 22,72 | 22,04 | 0,68 |
| 01-09094 | 24,81 | 24,07 | 23,41 | 22,73 | 22,05 | 0,69 |
| 00-03291 | 24,83 | 24,09 | 23,45 | 22,73 | 22,07 | 0,69 |
| | | | | | | 0,68 |

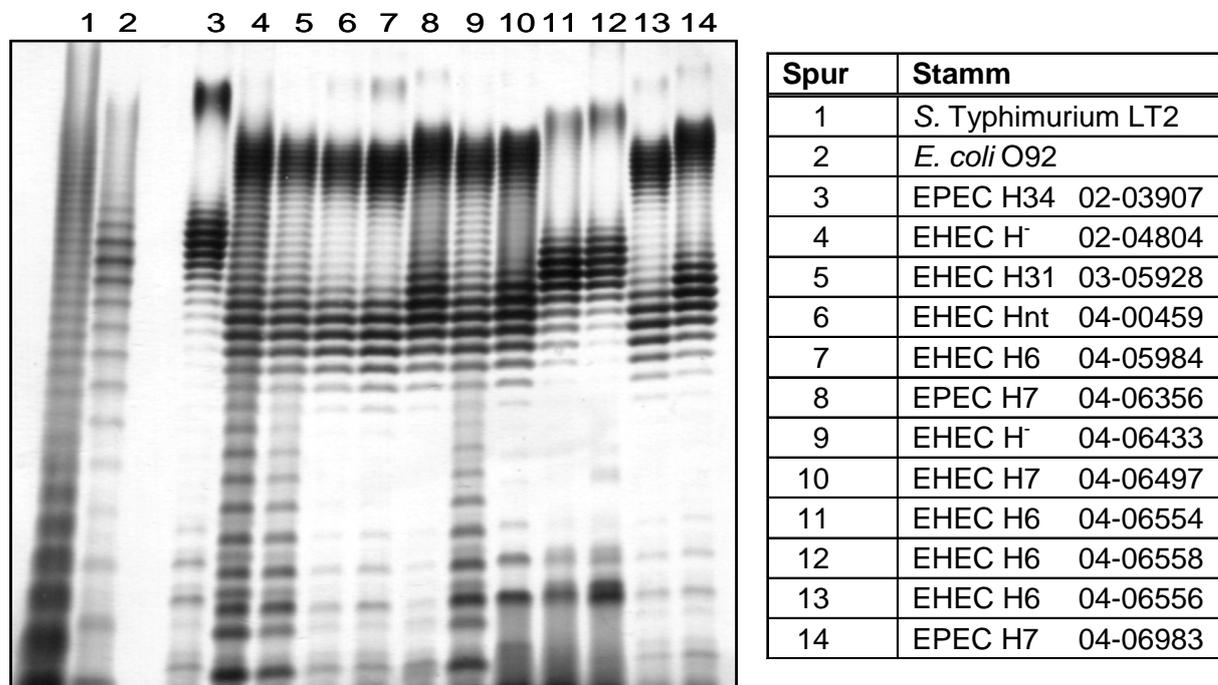
Anhang 13: LPS-Muster von *E. coli* O26-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 01-10455 |
| 4 | 01-10277 |
| 5 | 01-11458 |
| 6 | 01-11089 |
| 7 | 01-11898 |

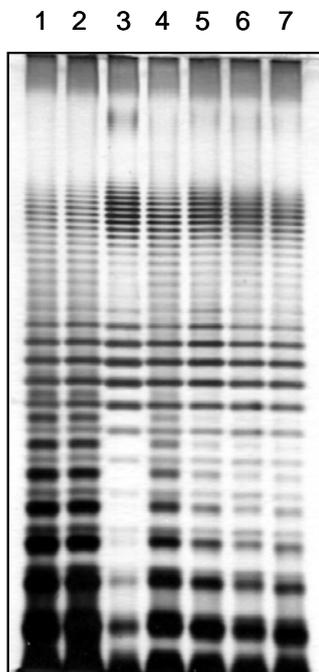
| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 01-10455 | 26,36 | 25,86 | 25,28 | 24,79 | 24,24 | 0,53 |
| 01-10227 | 26,45 | 25,94 | 25,36 | 24,86 | 24,32 | 0,53 |
| 01-11458 | 26,62 | 25,98 | 25,44 | 24,94 | 24,39 | 0,56 |
| 01-11089 | 26,63 | 26,08 | 25,58 | 25,03 | 24,48 | 0,54 |
| 01-11898 | 26,51 | 26,01 | 25,51 | 24,93 | 24,41 | 0,53 |
| 01-11788 | 26,50 | 26,04 | 25,46 | 24,92 | 24,41 | 0,52 |
| 01-11918 | 26,19 | 25,65 | 25,16 | 24,53 | 24,03 | 0,54 |
| 01-12267 | 26,63 | 26,11 | 25,53 | 25,02 | 24,51 | 0,53 |
| 01-11961 | 26,66 | 26,15 | 25,53 | 25,05 | 24,54 | 0,53 |
| | | | | | | 0,53 |

Anhang 14: LPS-Muster von *E. coli* O55-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 02-03907 | 31,33 | 30,65 | 29,94 | 29,25 | 28,53 | 0,70 |
| 02-04804 | 27,04 | 26,32 | 25,57 | 24,86 | 24,11 | 0,73 |
| 03-05928 | 26,99 | 26,27 | 25,57 | 24,82 | 24,11 | 0,72 |
| 04-00459 | 27,09 | 26,36 | 25,65 | 24,89 | 24,18 | 0,73 |
| 04-05984 | 27,04 | 26,32 | 25,61 | 24,89 | 24,18 | 0,72 |
| 04-06356 | 27,09 | 26,36 | 25,65 | 24,93 | 24,22 | 0,72 |
| 04-06433 | 27,04 | 26,32 | 25,61 | 24,89 | 24,18 | 0,72 |
| 04-06497 | 27,13 | 26,40 | 25,69 | 24,97 | 24,26 | 0,72 |
| 04-06554 | 29,34 | 28,62 | 27,93 | 27,20 | 26,51 | 0,71 |
| 04-06558 | 29,88 | 29,19 | 28,48 | 27,75 | 27,09 | 0,70 |
| 04-06565 | 27,18 | 26,45 | 25,73 | 25,01 | 24,33 | 0,71 |
| 04-06983 | 27,86 | 27,13 | 26,45 | 25,73 | 25,05 | 0,70 |
| | | | | | | 0,71 |

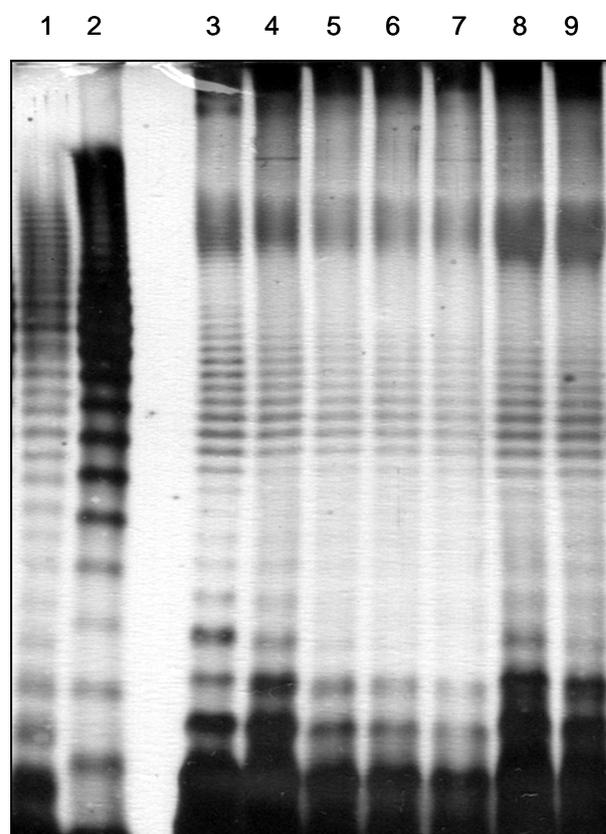
Anhang 15: LPS-Muster von *E. coli* O91-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>E. coli</i> O92 |
| 2 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |
| 3 | 99-03525 |
| 4 | 99-03703 |
| 5 | 99-05166 |
| 6 | 99-05170 |
| 7 | 99-09247 |
| 8 | 99-09438 |
| 9 | 99-09588 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 99-03525 | 18,87 | 17,69 | 16,90 | 15,96 | 15,01 | 0,97 |
| 99-03703 | 18,80 | 17,83 | 16,88 | 15,95 | 14,99 | 0,95 |
| 99-05166 | 18,68 | 17,72 | 16,75 | 15,86 | 14,91 | 0,94 |
| 99-05170 | 18,77 | 17,81 | 16,87 | 15,93 | 14,98 | 0,95 |
| 99-09247 | 18,88 | 17,90 | 16,95 | 16,01 | 15,05 | 0,96 |
| 99-09438 | 18,94 | 17,95 | 17,00 | 16,05 | 15,09 | 0,96 |
| 99-09588 | 18,92 | 17,95 | 16,97 | 16,03 | 15,07 | 0,96 |
| | | | | | | 0,96 |

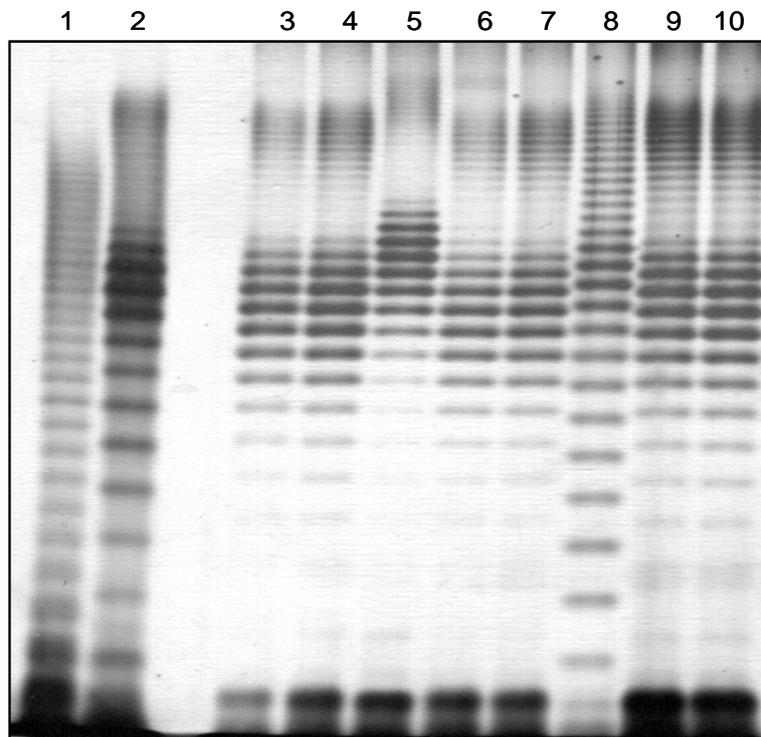
Anhang 16: LPS-Muster von *E. coli* O100-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | O100 Ref.-St. |
| 4 | 00-06066 |
| 5 | 00-06521 |
| 6 | 00-06608 |
| 7 | 00-07096 |
| 8 | 02-04410 |
| 9 | 02-11534 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 00-06066 | 22,72 | 22,25 | 21,75 | 21,22 | 20,66 | 0,52 |
| 00-06521 | 22,84 | 22,34 | 21,80 | 21,27 | 20,71 | 0,53 |
| 00-06608 | 22,77 | 22,26 | 21,73 | 21,21 | 20,68 | 0,52 |
| 00-07096 | 22,76 | 22,28 | 21,75 | 21,23 | 20,68 | 0,52 |
| 02-04410 | 22,73 | 22,25 | 21,72 | 21,20 | 20,68 | 0,51 |
| 02-11534 | 22,76 | 22,25 | 21,72 | 21,20 | 20,66 | 0,53 |
| | | | | | | 0,52 |

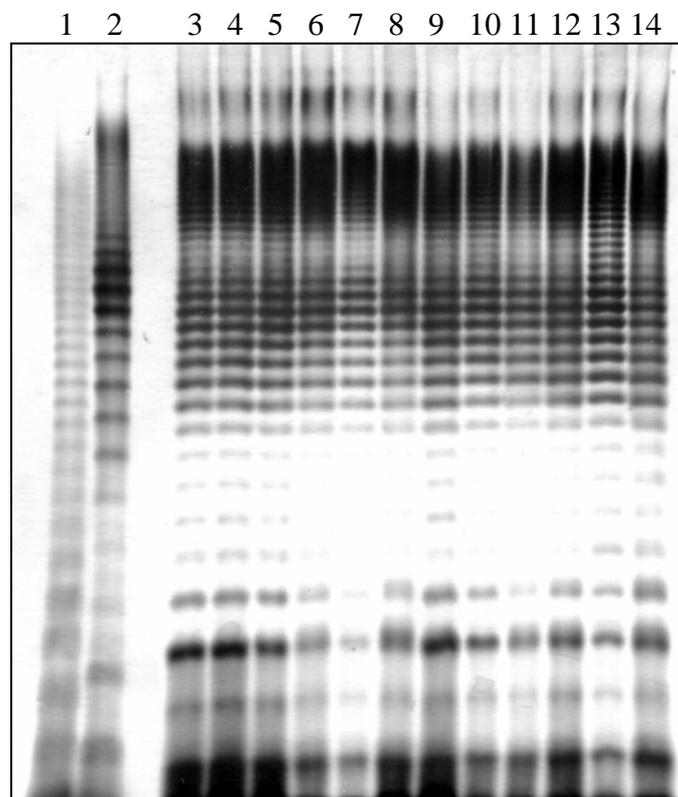
Anhang 17: LPS-Muster von *E. coli* O103:H2/H- -Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 02-03044 |
| 4 | 02-03624 |
| 5 | 02-03702 |
| 6 | 02-03709 |
| 7 | 02-03736 |
| 8 | 02-03742 Ont:H2 |
| 9 | 02-03802 |
| 10 | 02-03803 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 02-03044 | 30,60 | 29,66 | 28,67 | 27,68 | 26,74 | 0,97 |
| 02-03624 | 30,60 | 29,62 | 28,68 | 27,64 | 26,71 | 0,97 |
| 02-03702 | 30,56 | 29,63 | 28,65 | 27,66 | 26,76 | 0,95 |
| 02-03709 | 30,60 | 29,66 | 28,69 | 27,65 | 26,71 | 0,97 |
| 02-03736 | 30,64 | 29,70 | 28,73 | 27,73 | 26,78 | 0,97 |
| 02-03742 | 30,06 | 29,03 | 27,90 | 26,82 | 25,79 | 1,07 |
| 02-03802 | 30,76 | 29,81 | 28,89 | 27,79 | 26,83 | 0,98 |
| 02-03803 | 31,01 | 30,04 | 29,04 | 27,99 | 26,98 | 1,01 |
| 02-04243 | 30,18 | 29,37 | 28,58 | 27,73 | 26,92 | 0,82 |
| | | | | | | 0,97 |

Anhang 18: LPS-Muster von *E. coli* O111-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)

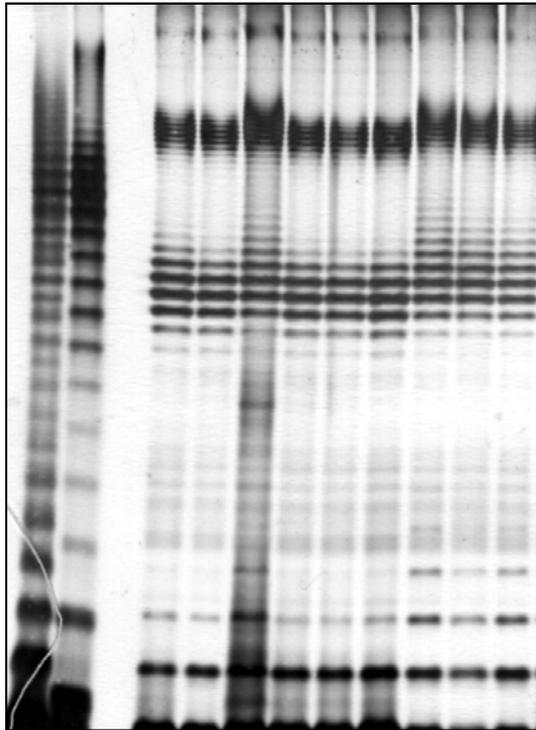


| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 03-03235 |
| 4 | 03-03236 |
| 5 | 03-03237 |
| 6 | 03-03238 |
| 7 | 03-03239 |
| 8 | 03-03240 |
| 9 | 03-03243 |
| 10 | 03-03244 |
| 11 | 03-03245 |
| 12 | 03-03246 |
| 13 | 03-03247 |
| 14 | 03-03248 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 03-03235 | 20,33 | 19,43 | 18,55 | 17,69 | 16,86 | 0,87 |
| 03-03236 | 20,15 | 19,29 | 18,42 | 17,60 | 16,75 | 0,85 |
| 03-03237 | 19,98 | 19,13 | 18,27 | 17,45 | 16,63 | 0,84 |
| 03-03238 | 20,03 | 19,20 | 18,32 | 17,48 | 16,66 | 0,84 |
| 03-03239 | 20,10 | 19,24 | 18,35 | 17,52 | 16,69 | 0,85 |
| 03-03240 | 20,10 | 19,22 | 18,33 | 17,49 | 16,66 | 0,86 |
| 03-03243 | 20,15 | 19,29 | 18,41 | 17,55 | 16,72 | 0,86 |
| 03-03244 | 20,20 | 19,34 | 18,46 | 17,63 | 16,80 | 0,85 |
| 03-03245 | 19,98 | 19,15 | 18,29 | 17,50 | 16,69 | 0,82 |
| 03-03246 | 20,18 | 19,29 | 18,44 | 17,62 | 16,79 | 0,85 |
| 03-03247 | 20,28 | 19,41 | 18,55 | 17,71 | 16,91 | 0,84 |
| 03-03248 | 20,20 | 19,34 | 18,47 | 17,62 | 16,79 | 0,85 |
| | | | | | | 0,85 |

Anhang 19: LPS-Muster von *E. coli* O113-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)

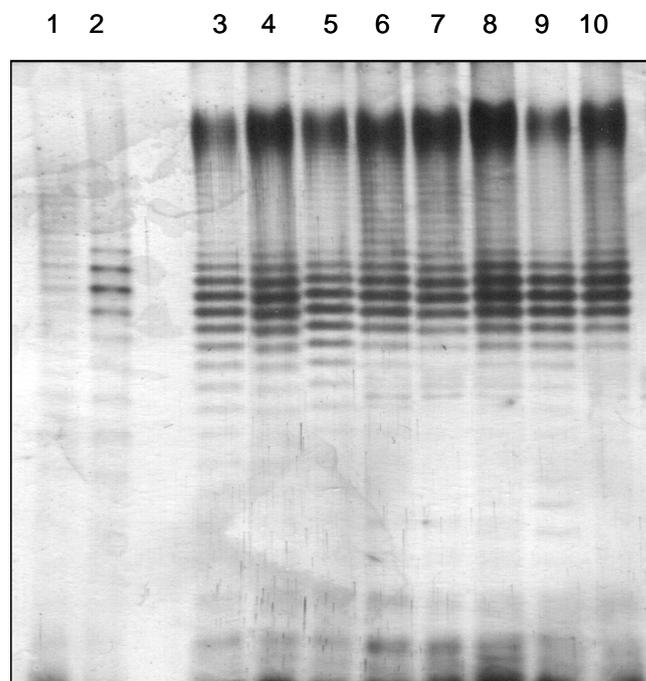
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 01-00496 |
| 4 | 01-00498 |
| 5 | 01-01006 |
| 6 | 01-01901 |
| 7 | 01-01902 |
| 8 | 01-01903 |
| 9 | 01-07345 |
| 10 | 01-09093 |
| 11 | 01-09700 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 01-00496 | 23,78 | 23,10 | 22,44 | 21,75 | 21,12 | 0,67 |
| 01-00498 | 23,67 | 23,06 | 22,37 | 21,71 | 21,05 | 0,66 |
| 01-01006 | 23,62 | 22,97 | 22,29 | 21,64 | 20,98 | 0,66 |
| 01-01901 | 23,62 | 22,97 | 22,29 | 21,63 | 20,97 | 0,66 |
| 01-01902 | 23,66 | 23,00 | 22,32 | 21,63 | 21,00 | 0,67 |
| 01-01903 | 23,58 | 22,92 | 22,27 | 21,61 | 20,95 | 0,66 |
| 01-07345 | 23,64 | 22,99 | 22,33 | 21,67 | 21,01 | 0,66 |
| 01-09093 | 23,65 | 23,00 | 22,34 | 21,64 | 21,01 | 0,66 |
| 01-09700 | 23,65 | 22,99 | 22,33 | 21,64 | 21,00 | 0,66 |
| | | | | | | 0,66 |

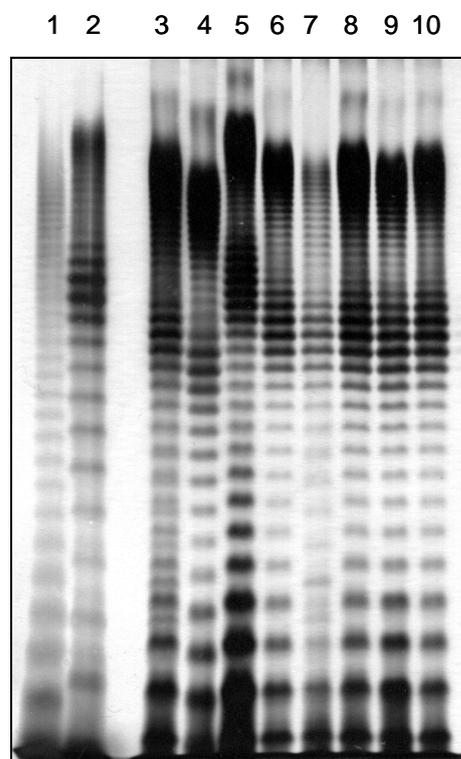
Anhang 20: LPS-Muster von *E. coli* O117-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 01-11948 |
| 4 | 01-11949 |
| 5 | 01-11950 |
| 6 | 01-11952 |
| 7 | 01-11953 |
| 8 | 01-11955 |
| 9 | 01-11960 |
| 10 | 01-11962 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 01-11948 | 30,28 | 29,42 | 28,57 | 27,74 | 26,73 | 0,89 |
| 01-11949 | 30,11 | 29,27 | 28,46 | 27,63 | 26,60 | 0,88 |
| 01-11950 | 30,33 | 29,51 | 28,70 | 27,81 | 26,81 | 0,88 |
| 01-11952 | 30,19 | 29,34 | 28,49 | 27,66 | 26,63 | 0,89 |
| 01-11953 | 30,06 | 29,27 | 28,42 | 27,63 | 26,60 | 0,86 |
| 01-11955 | 30,18 | 29,33 | 28,52 | 27,69 | 26,67 | 0,88 |
| 01-11960 | 30,18 | 29,33 | 28,52 | 27,68 | 26,66 | 0,88 |
| 01-11962 | 30,33 | 29,47 | 28,65 | 27,81 | 26,81 | 0,88 |
| | | | | | | 0,88 |

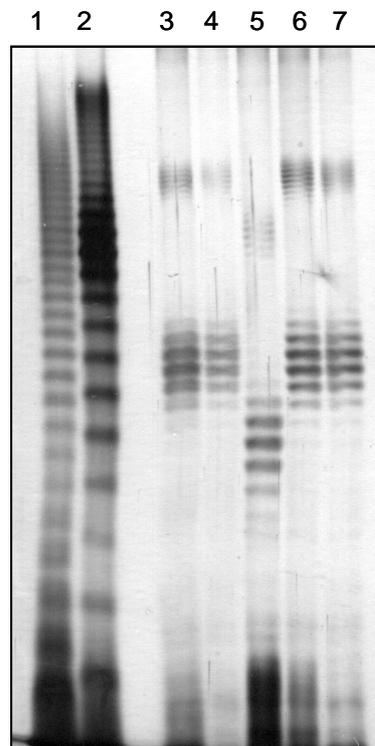
Anhang 21: LPS-Muster von *E. coli* O145-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 03-02989 |
| 4 | 03-02990 |
| 5 | 03-02997 |
| 6 | 03-03004 |
| 7 | 03-03005 |
| 8 | 03-03007 |
| 9 | 03-03010 |
| 10 | 03-03011 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 03-02989 | 22,25 | 21,44 | 20,65 | 19,89 | 19,15 | 0,78 |
| 03-02990 | 22,60 | 21,43 | 20,51 | 19,69 | 18,92 | 0,92 |
| 03-02997 | 22,87 | 22,18 | 21,37 | 20,59 | 19,84 | 0,76 |
| 03-03004 | 22,89 | 22,09 | 21,30 | 20,52 | 19,73 | 0,79 |
| 03-03005 | 22,89 | 22,09 | 21,30 | 20,52 | 19,77 | 0,78 |
| 03-03007 | 22,84 | 22,05 | 21,26 | 20,48 | 19,75 | 0,77 |
| 03-03010 | 22,69 | 21,91 | 21,13 | 20,36 | 19,63 | 0,77 |
| 03-03011 | 22,71 | 21,97 | 21,19 | 20,41 | 19,68 | 0,76 |
| | | | | | | 0,77 |

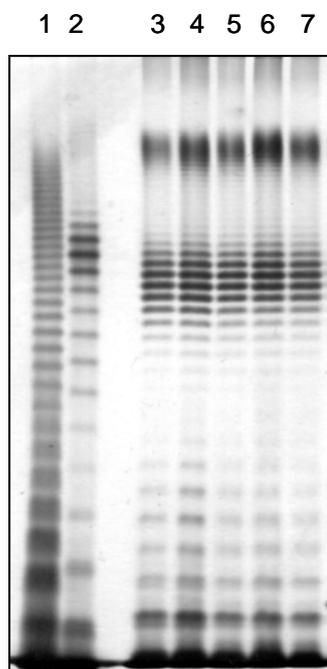
Anhang 22: LPS-Muster von *E. coli* O146-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|--------------------|
| 1 | S. Typhimurium LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 02-02109 |
| 4 | 02-02123 |
| 5 | 02-02140 |
| 6 | 02-02177 |
| 7 | 02-02793 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 02-02109 | 18,52 | 18,00 | 17,47 | 17,00 | 16,35 | 0,54 |
| 02-02123 | 18,35 | 17,87 | 17,35 | 16,83 | 16,31 | 0,51 |
| 02-02140 | 16,31 | 15,75 | 15,21 | 14,65 | 14,10 | 0,55 |
| 02-02177 | 18,47 | 17,90 | 17,38 | 16,83 | 16,32 | 0,54 |
| 02-02793 | 18,53 | 17,98 | 17,41 | 16,86 | 16,35 | 0,55 |
| | | | | | | 0,54 |

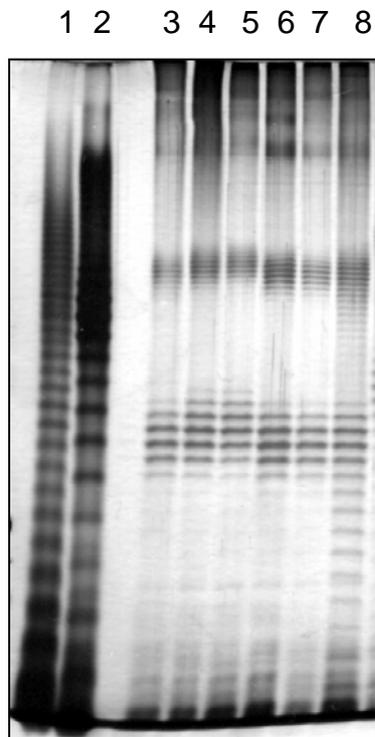
Anhang 23: LPS-Muster von *E. coli* O157-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 00-01210 |
| 4 | 00-01211 |
| 5 | 00-01213 |
| 6 | 00-01214 |
| 7 | 00-01215 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 00-01210 | 28,13 | 27,41 | 26,70 | 25,98 | 25,29 | 0,71 |
| 00-01211 | 27,96 | 27,26 | 26,56 | 25,85 | 25,17 | 0,70 |
| 00-01213 | 27,92 | 27,23 | 26,48 | 25,82 | 25,14 | 0,70 |
| 00-01214 | 27,86 | 27,13 | 26,48 | 25,82 | 25,14 | 0,68 |
| 00-01215 | 27,86 | 27,13 | 26,43 | 25,77 | 25,10 | 0,69 |
| 00-01216 | 27,86 | 27,18 | 26,48 | 25,82 | 25,14 | 0,68 |
| 00-01217 | 27,86 | 27,13 | 26,44 | 25,78 | 25,11 | 0,69 |
| 00-01218 | 27,88 | 27,15 | 26,45 | 25,80 | 25,09 | 0,70 |
| 00-01219 | 27,83 | 27,15 | 26,46 | 25,76 | 25,10 | 0,68 |
| 00-01223 | 27,84 | 27,17 | 26,48 | 25,78 | 25,11 | 0,68 |
| 00-02203 | 27,84 | 27,17 | 26,48 | 25,83 | 25,11 | 0,68 |
| 00-02204 | 27,75 | 27,09 | 26,40 | 25,75 | 25,05 | 0,68 |
| | | | | | | 0,69 |

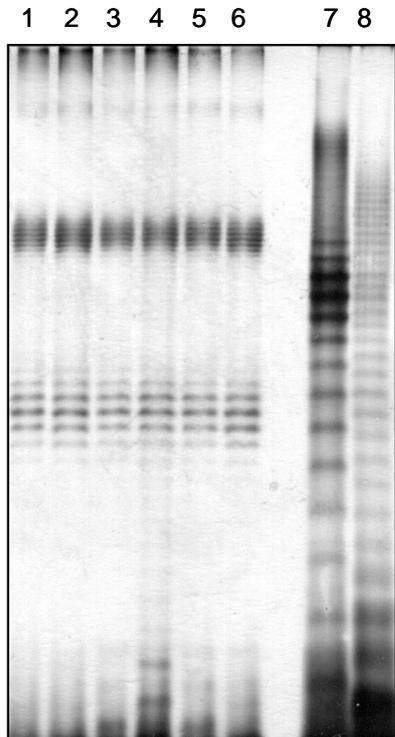
Anhang 24: LPS-Muster von *E. coli* O174-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Referenzstamm |
|------|---------------------------|
| 1 | <i>S. Typhimurium</i> LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 00-01743 |
| 4 | 00-02016 |
| 5 | 00-02040 |
| 6 | 00-02118 |
| 7 | 00-02119 |
| 8 | 00-02348 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 00-01743 | 21,38 | 20,82 | 20,28 | 19,78 | 19,27 | 0,53 |
| 00-02016 | 21,29 | 20,76 | 20,23 | 19,73 | 19,22 | 0,52 |
| 00-02040 | 21,29 | 20,76 | 20,25 | 19,73 | 19,21 | 0,52 |
| 00-02118 | 21,26 | 20,73 | 20,20 | 19,70 | 19,17 | 0,52 |
| 00-02119 | 21,23 | 20,70 | 20,18 | 19,68 | 19,15 | 0,52 |
| 00-02348 | 21,20 | 20,67 | 20,15 | 19,65 | 19,10 | 0,52 |
| | | | | | | 0,52 |

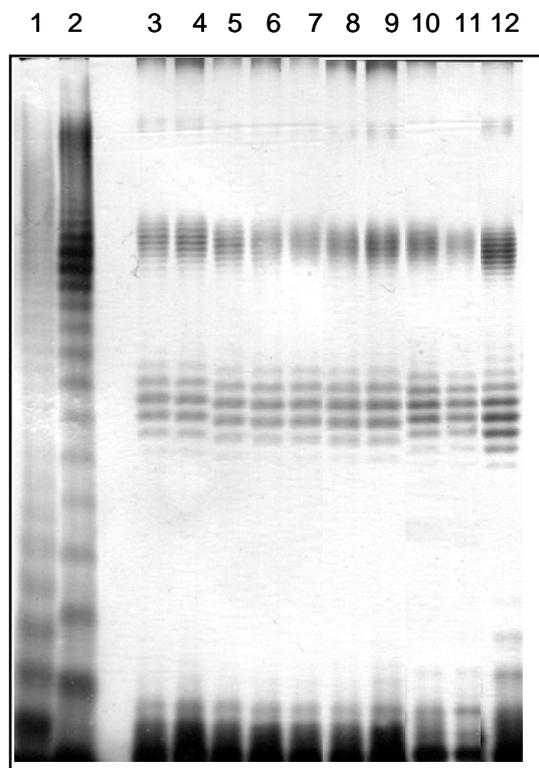
Anhang 25: LPS-Muster von E. coli Ont:H2-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | 01-06911 |
| 2 | 01-05173 |
| 3 | 01-02914 |
| 4 | 00-06606 |
| 5 | 00-05336 |
| 6 | 00-00766 |
| 7 | <i>E. coli</i> O92 |
| 8 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 01-06911 | 25,81 | 25,22 | 24,70 | 24,17 | 23,61 | 0,55 |
| 01-05173 | 25,77 | 25,22 | 24,67 | 24,14 | 23,59 | 0,55 |
| 01-02914 | 25,79 | 25,20 | 24,65 | 24,12 | 23,60 | 0,55 |
| 00-06606 | 25,81 | 25,22 | 24,67 | 24,14 | 23,64 | 0,54 |
| 00-05336 | 25,72 | 25,17 | 24,62 | 24,09 | 23,55 | 0,54 |
| 00-00766 | 25,72 | 25,17 | 24,62 | 24,06 | 23,55 | 0,54 |
| | | | | | | 0,55 |

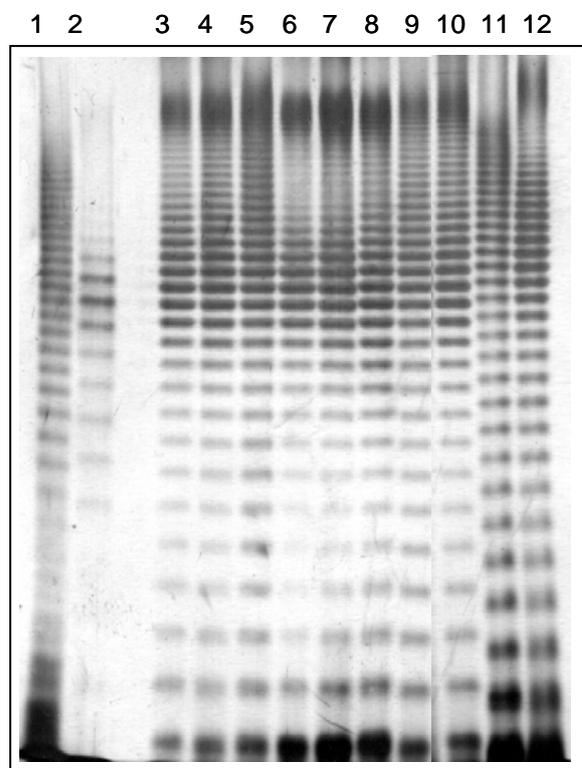
Anhang 26: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H8-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)



| Spur | Stamm |
|------|--------------------|
| 1 | S. Typhimurium 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 99-08257-1 |
| 4 | 99-08255 |
| 5 | 98-07956 |
| 6 | 02-11524 |
| 7 | 02-11515 |
| 8 | 00-01128 |
| 9 | 00-01127 |
| 10 | 03-05592 |
| 11 | 03-02480 |
| 12 | 02-00574 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 99-08257-1 | 26,93 | 26,29 | 25,70 | 25,12 | 24,60 | 0,58 |
| 99-08255 | 26,93 | 26,29 | 25,70 | 25,12 | 24,57 | 0,59 |
| 98-07956 | 26,87 | 26,21 | 25,59 | 25,03 | 24,51 | 0,59 |
| 02-11524 | 26,88 | 26,23 | 25,61 | 25,01 | 24,47 | 0,60 |
| 02-11515 | 26,87 | 26,24 | 25,59 | 25,03 | 24,48 | 0,60 |
| 00-01128 | 26,81 | 26,22 | 25,59 | 25,00 | 24,43 | 0,60 |
| 00-01127 | 26,89 | 26,23 | 25,61 | 25,01 | 24,50 | 0,60 |
| 03-05592 | 26,67 | 26,12 | 25,62 | 25,11 | 24,66 | 0,50 |
| 03-05592 | 26,72 | 26,20 | 25,66 | 25,17 | 24,70 | 0,51 |
| 02-00574 | 26,80 | 26,24 | 25,71 | 25,16 | 24,69 | 0,53 |
| | | | | | | 0,57 |

Anhang 27: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H11-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)

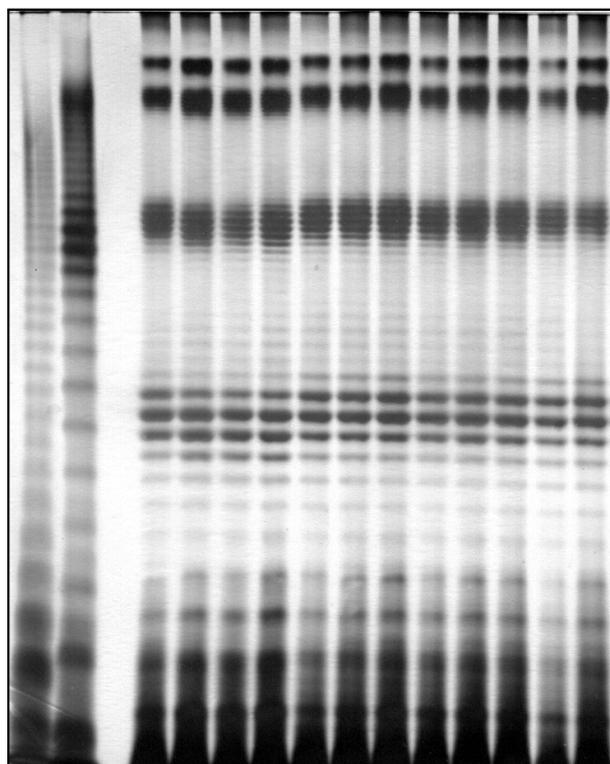


| Spur | Stamm |
|------|--------------------|
| 1 | S. Typhimurium 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 99-03111 |
| 4 | 99-06625 |
| 5 | 01-09679 |
| 6 | 01-11839 |
| 7 | 02-00197 |
| 8 | 96-08678 |
| 9 | 98-08447-1 |
| 10 | 01-04253 |
| 11 | S. Mara 1750 |
| 12 | S. Hafit 1522 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 99-03111 | 28,62 | 27,76 | 26,97 | 26,16 | 25,23 | 0,85 |
| 99-06625 | 28,73 | 27,83 | 27,03 | 26,22 | 25,27 | 0,87 |
| 01-09679 | 28,72 | 27,82 | 27,06 | 26,22 | 25,27 | 0,86 |
| 01-11839 | 28,77 | 27,84 | 27,10 | 26,27 | 25,35 | 0,86 |
| 02-00197 | 28,66 | 27,77 | 27,01 | 26,17 | 25,26 | 0,85 |
| 96-08678 | 28,71 | 27,78 | 27,00 | 26,17 | 25,28 | 0,86 |
| 98-08447-1 | 28,72 | 27,83 | 27,04 | 26,21 | 25,24 | 0,87 |
| 01-04253 | 28,66 | 27,74 | 26,97 | 26,11 | 25,18 | 0,87 |
| S.Mara | 27,98 | 27,16 | 26,37 | 25,48 | 24,60 | 0,85 |
| S.Hafit | 27,88 | 27,10 | 26,31 | 25,39 | 24,55 | 0,83 |
| | | | | | | 0,86 |

Anhang 28: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H18-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)

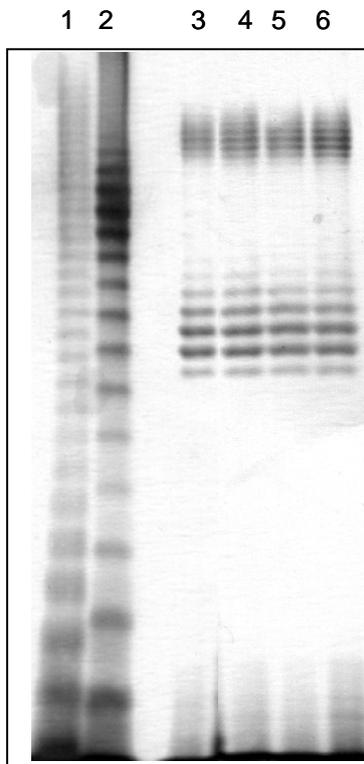
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



| Spur | Stamm |
|------|--------------------|
| 1 | S. Typhimurium 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 03-01763 |
| 4 | 03-01764 |
| 5 | 03-02447 |
| 6 | 03-04841 |
| 7 | 01-05081 |
| 8 | 01-05084 |
| 9 | 01-08110 |
| 10 | 00-01119 |
| 11 | 00-07558 |
| 12 | 98-05298 |
| 13 | 98-05420 |
| 14 | 98-05478 |

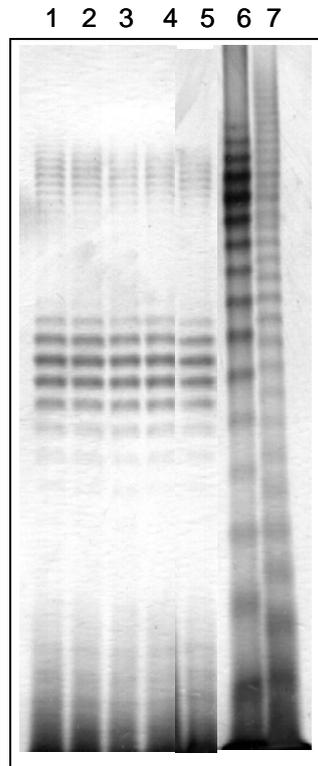
| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 03-01763 | 20,75 | 20,09 | 19,47 | 18,91 | 18,41 | 0,59 |
| 03-01764 | 20,80 | 20,16 | 19,51 | 18,95 | 18,43 | 0,59 |
| 03-02447 | 20,83 | 20,21 | 19,56 | 19,00 | 18,45 | 0,60 |
| 03-04841 | 20,81 | 20,15 | 19,52 | 18,96 | 18,44 | 0,59 |
| 01-05081 | 20,79 | 20,13 | 19,54 | 19,00 | 18,48 | 0,58 |
| 01-05084 | 20,79 | 20,11 | 19,54 | 18,98 | 18,46 | 0,58 |
| 01-08110 | 20,78 | 20,12 | 19,55 | 18,99 | 18,47 | 0,58 |
| 00-01119 | 20,81 | 20,14 | 19,55 | 18,99 | 18,48 | 0,58 |
| 00-07558 | 20,77 | 20,12 | 19,53 | 18,97 | 18,45 | 0,58 |
| 98-05298 | 20,74 | 20,09 | 19,50 | 18,97 | 18,45 | 0,57 |
| 98-05420 | 20,76 | 20,10 | 19,51 | 18,96 | 18,49 | 0,57 |
| 98-05478 | 20,76 | 20,10 | 19,51 | 18,98 | 18,44 | 0,58 |
| | | | | | | 0,58 |

Anhang 29: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H19-Stämmen



| Spur | Stamm |
|------|--------------------|
| 1 | S. Typhimurium 618 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 98-08660 |
| 4 | 01-03482 |
| 5 | 00-10717-1 |
| 6 | 00-00847 |

Anhang 30: LPS-Muster von *E. coli* Ont:H28-Stämmen und deren ermittelte RU-Werte (in kDa)

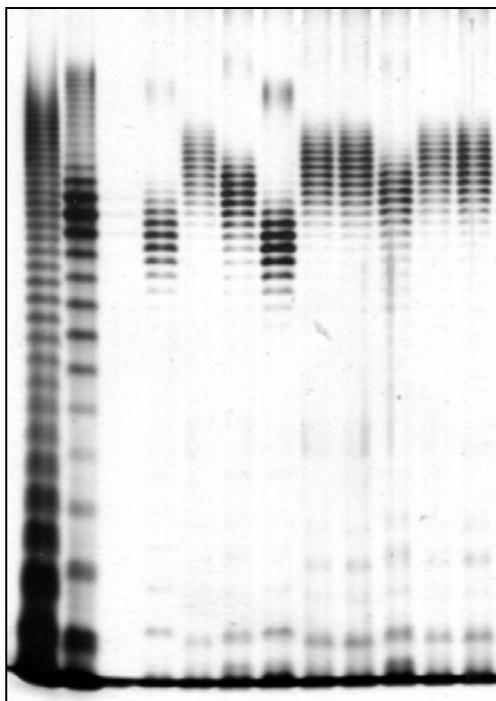


| Spur | Stamm |
|------|---------------------------|
| 1 | 99-09350 |
| 2 | 99-09349 |
| 3 | 99-06301 |
| 4 | 99-05164 |
| 5 | 00-06600 |
| 6 | <i>E. coli</i> O92 |
| 7 | <i>S. Typhimurium</i> 618 |

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 99-09350 | 22,26 | 21,59 | 20,95 | 20,35 | 19,78 | 0,62 |
| 99-09349 | 22,20 | 21,56 | 20,95 | 20,33 | 19,76 | 0,61 |
| 99-06301 | 22,23 | 21,59 | 20,97 | 20,35 | 19,78 | 0,61 |
| 99-05164 | 22,24 | 21,63 | 20,98 | 20,36 | 19,79 | 0,61 |
| 00-06600 | 22,22 | 21,58 | 20,96 | 20,36 | 19,79 | 0,61 |
| | | | | | | 0,61 |

Anhang 31: LPS-Muster von *E. coli* O157-Stämmen verschiedener Pathovaren

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



| Spur | Referenzstamm |
|------|--------------------|
| 1 | S. Typhimurium LT2 |
| 2 | <i>E. coli</i> O92 |
| 3 | 99-07346 EPEC |
| 4 | 99-05610 EHEC |
| 5 | 02-09516 EPEC |
| 6 | 02-04539 EPEC |
| 7 | 01-06348 EHEC |
| 8 | 00-10153 EHEC |
| 9 | 00-09899 EPEC |
| 10 | 00-04295 EHEC |
| 11 | 00-03940 EHEC |

RU-Werte von *E. coli* O157-Stämmen des Pathovars EPEC:

| Stamm | MW1 | MW2 | MW3 | MW4 | MW5 | RU |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 99-07346 | 26 | 25,19 | 24,47 | 23,72 | 23,03 | 0,74 |
| 02-09516 | 25,88 | 25,18 | 24,37 | 23,65 | 22,92 | 0,74 |
| 02-04539 | 25,86 | 25,12 | 24,36 | 23,64 | 22,95 | 0,73 |
| 00-09899 | 25,9 | 25,2 | 24,43 | 23,68 | 22,97 | 0,73 |
| 00-01211 | 26,67 | 25,95 | 25,25 | 24,43 | 23,62 | 0,76 |
| 00-06292-1 | 25,9 | 25,11 | 24,34 | 23,59 | 22,94 | 0,74 |
| 00-06292-2 | 25,85 | 25,06 | 24,3 | 23,56 | 22,87 | 0,75 |
| 00-03896 | 24,56 | 23,81 | 23,12 | 22,39 | 21,63 | 0,73 |
| | | | | | | 0,74 |

Anhang 32: Dendrogramm der *E. coli*- O-Typ Referenz-LPS-Muster

