

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. M. Frosch

Charakterisierung und Antibiotika-Resistenzprofil von Shiga Toxin-produzierenden
Escherichia coli Isolaten von Patienten und Ausscheidern

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Jeannette Gräfin von Maldeghem
aus München

Würzburg, November 2001

Referent: Priv.-Doz. Dr. Herbert Schmidt

Koreferent: Prof. Dr. Heidrun Moll

Dekan: Prof. Dr. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Februar 2002

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1. Abkürzungen	9
2.2. Bakterienstämme	11
2.3. Kulturmedien	12
2.4. Feste Nährböden	12
2.5. Puffer und Lösungen	14
2.6. Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest	16
2.7. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	19
2.8. Übertragung von Antibiotika-Resistenzen durch Konjugation	20
2.9. Herstellung eines Nalidixinsäure-resistenten <i>E. coli</i> Stammes	21
2.10. Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von EHEC	22
2.11. Primer für die <i>stxB</i> ₁ - und <i>stxB</i> ₂ -PCR	22
2.12. Reaktionsansatz zum Nachweis von <i>stx</i> -Genen	23
2.13. PCR-Programm für <i>stx</i> -Gene	23
2.14. Agarosegele zur DNA-Auftrennung	24
2.15. Differenzierung zwischen <i>stx</i> ₂ und <i>stx</i> _{2c}	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Nachweis des <i>stx</i> -Genotypes von STEC mittels Polymerasekettenreaktion	25
3.2. Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von STEC-Isolaten von Patienten und Ausscheidern mit dem Agardiffusionstest	25
3.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) verschiedener Antibiotika bei resistenten STEC-Stämmen mit Hilfe des Etest®	33
3.4. Übertragung von Antibiotika-Resistenzen	37
4. Diskussion	39
5. Zusammenfassung	49
6. Literaturverzeichnis	50

1. Einleitung

Escherichia coli kann als Träger verschiedener Virulenzeigenschaften extraintestinale und enterale Erkrankungen verursachen. Organe außerhalb des Darmes, die häufig von dem gramnegativen Stäbchenbakterium befallen werden, sind der Urogenitaltrakt, die Gallenblase, das Peritoneum, die Lunge sowie die Meningen, vor allem bei Früh- und Neugeborenen. Darüber hinaus werden *E. coli*-Bakterien häufig als Erreger von Wundinfekten und Septikämien isoliert [4].

Nach heutigem Kenntnisstand lassen sich darmpathogene *E. coli*-Bakterien auf Grund charakteristischer klinischer und epidemiologischer Eigenschaften in fünf Gruppen einteilen: Erstens enteropathogene *E. coli* (EPEC), die bis heute eine häufige bakterielle Ursache frühkindlicher Enteritiserkrankungen darstellen. Zweitens enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC), die meist als Erreger einer Reise-Diarrhö mit wässrigen, zum Teil choleraähnlichen Durchfällen aus den warmen Ländern eingeschleppt werden. Drittens enteroinvasive *E. coli* (EIEC), die als Erreger der bakteriellen Ruhr, vornehmlich in Ländern mit niedrigen Hygienestandards auftreten [4,9,60]. Viertens enteroaggregative *E. coli* (EAEC), die bei Kindern in Entwicklungsländern als Erreger von akuten und chronischen Durchfällen diagnostiziert werden, aber auch in Deutschland sporadisch bei hospitalisierten Kindern als Erreger von persistierenden Diarrhöen isoliert werden [58,61,62,64].

Fünftens beschrieben Riley et al. [5] im Jahre 1983 erstmals darmpathogene *E. coli*-Stämme des Serotyps O157:H7. Anlass für ihre Entdeckung war die Erkrankung von 47 Gästen einer Fast-food-Kette in den USA an hämorrhagischer Colitis (HC) nach Verzehr von EHEC-kontaminiertem Rindfleisch. Die von den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) durchgeführte epidemiologische Untersuchung identifizierte den bis dahin unbekanntem darmpathogenen *Escherichia coli* Serotyp O157:H7 aus Stühlen der Erkrankten, sowie aus dem kontaminierten Hackfleisch [30]. Im selben Jahr konnten in einem Pflegeheim in Kanada während eines Ausbruchs blutiger Durchfallerkrankungen wiederum *E. coli* des Serotyps O157:H7 als Verursacher einer hämorrhagischen Colitis aus Stuhlproben der erkrankten Bewohnern isoliert werden [1].

Die Bezeichnung der neuen Krankheitserreger als „enterohämorrhagische *E. coli*“ (EHEC) leitete sich von dem von ihnen verursachtem Krankheitsbild, der primär hämorrhagisch verlaufenden Colitis, ab [7]. Später wurde in weiteren Untersuchungen neben *E. coli* der Serogruppe O157, der für einen Großteil der Infektionen verantwortlich ist, auch eine Vielzahl anderer Serovare, wie *E. coli* O26, O111 und O103 als Erreger von Epidemien mit

dem Krankheitsbild einer primär hämorrhagisch verlaufenden Colitis isoliert [3,5]. Diese neue Gruppe darmpathogener *E. coli*-Bakterien unterschied sich deutlich von den bis dahin bekannten darmpathogenen Kolibakterien in ihrer Epidemiologie, den phänotypischen Eigenschaften, sowie in denen von ihnen verursachten schweren, teils zum Tode führenden Krankheitsbildern [9]. Da es allen EHEC-Stämme gemeinsam ist, daß sie als wichtigsten Virulenzfaktor Shiga Toxin exprimieren, werden sie auch Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) genannt [6,7,9].

Besonders in den Industriestaaten mit hochentwickelter Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie sind Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) in den letzten Jahren zu einem gesundheitlichen Problem geworden [5,8].

STEC können mit einem sehr weitem Spektrum unterschiedlicher Erkrankungen assoziiert sein. So können durch STEC verursachte Erkrankungen sowohl sporadisch auftreten, als auch zu großen Ausbrüchen führen, die häufig von einer kontaminierten Lebensmittelquelle ausgehen. Obwohl die meisten Infektionen mit STEC leicht verlaufen und deshalb vielfach unerkant bleiben, können sie insbesondere bei Säuglingen, Kleinkindern, alten Menschen und anderen Abwehrgeschwächten zu klinisch schweren Krankheitsbildern und Folgeerkrankungen führen [5]. Die Inkubationszeit einer durch STEC hervorgerufenen Infektion beträgt in Abhängigkeit von der Infektionsdosis zwischen drei und neun Tagen. Die Erkrankung beginnt mit wäßrigen Durchfällen, die im Verlauf der Erkrankung zunehmend blutig erscheinen können. Selten tritt Fieber auf, oft jedoch Übelkeit und zunehmende Abdominalschmerzen. In 10-20% der Fälle entwickelt sich aus der Gastroenteritis eine hämorrhagische Colitis, begleitet von Leibschmerzen, blutigen Stuhl und Fieber. In etwa 5-10% der Fälle entwickeln sich hieraus die lebensbedrohlichen postinfektiösen Syndrome, wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), das durch eine mikroangiopathische, hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und einer schwere Nephropathie mit Hämaturie und Proteinurie definiert ist. Gelegentlich werden auch Bluthochdruck, zerebrale Krampfanfälle und multiple Organbeteiligung gefunden. Circa 10-30% der Erkrankungen enden in einer terminalen Niereninsuffizienz [5,9]. Vornehmlich beim Erwachsenen können durch STEC bedingte Infektionen zum histopathologisch dem HUS verwandten Symptomkomplex der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), auch als Moschkowitz-Syndrom bekannt, führen, bei dem neurologische Symptome im Vordergrund stehen [13].

Seit ihrer Entdeckung führten EHEC-Infektionen weltweit zu einer Reihe von teilweise schwerwiegenden Ausbrüchen von Durchfällen, die nicht selten mit der Entwicklung der

lebensbedrohlichen postinfektiösen Syndrome verbunden waren. So erkrankten beispielsweise in einem Pflegeheim 55 von 169 Bewohnern an einer Enteritis, die durch *E. coli* O157:H7 verursacht wurde. Zwölf dieser Patienten entwickelten im Verlauf ein hämolytisch-urämisches Syndrom, an welchem insgesamt 11 Patienten verstarben. In einem anderem Fall erkrankten in einem Heim für geistig Behinderte 20 Personen an einer Infektion, die durch *E. coli* O157:H7 verursacht wurde. Acht von ihnen entwickelten ein hämolytisch-urämisches Syndrom, an welchem wiederum vier verstarben [38,40,42].

Die Pathogenität der Erreger wird hauptsächlich durch die von Ihnen gebildeten phagenkodierte Toxine, die Shiga Toxine (Stx) hervorgerufen, die synonym auch als Verotoxine bezeichnet werden. Auf Grund ihrer genetischen und serologischen Eigenschaften werden sie in die Subtypen Stx1, Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e und Stx2f unterteilt [65]. Die Bezeichnung Shiga Toxine beruht auf der strukturellen Verwandtschaft der Toxine mit dem von *Shigella dysenteriae* Typ 1 gebildeten Shiga Toxin [5,19].

Bei den Shiga Toxinen handelt es sich um rRNA-*N*-Glykosidasen, die als potente Inhibitoren der eukaryontischen Proteinbiosynthese wirken. Die Toxine sind bifunktionell aufgebaut. Sie bestehen jeweils aus einer A-Untereinheit, die von fünf, die Bindung an Glykosphingolipid-Rezeptoren vermittelnden B-Untereinheiten, umgeben ist. Die A-Untereinheit stellt die eigentliche rRNA-*N*-Glykosidase dar, die nach ihrer Translokation in der eukaryotischen Zelle aktiv wird. Der Shiga Toxin-Rezeptor, der vornehmlich auf kapillären Endothel des Magen-Darm-Trakts, der Niere aber auch im Gehirn vorkommt [49], ist ein Glykolipid, das Globotriaosyl-Ceramid (GB₃) [9].

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der EHEC ist die Bildung von Intimininen. Intimine sind Oberflächenproteine, die nach der initialen Anheftung über Fimbrien einen besonders engen Kontakt zwischen Bakterien und Darmepithelzellen vermitteln. Hierbei kommt es zu Umstrukturierungsvorgängen im Zytoskelett der Wirtszelle, die zu einer Zerstörung des Mikrovillisaumes der Epithelzelle führen. Es kommt zu becherartigen Ausstülpungen der Enterozyten, auf denen die Bakterien in engem Kontakt angeheftet sind. Das dichte Anheften und Zerstören des Mikrovillisaums wird auch als "attaching and effacing"-Läsion bezeichnet. Die gesamte genetische Information, die für die Ausbildung der charakteristischen Läsionen verantwortlich ist, liegt auf einer ca. 43 kb großen Pathogenitätsinsel im EHEC-Chromosom, dem "Locus of enterocyte effacement (LEE)" [30,50,65]. Darüberhinaus besitzen EHEC verschiedene Plasmide. Ein 93,6 kb großes Plasmid, p0157, kann praktisch in allen klinischen EHEC O157-Isolaten nachgewiesen werden [65]. Daneben konnten mit geringerer Häufig-

keit zwei weitere kleine Plasmide mit jeweils einer Größe von 6,7 kb und 3,3 kb nachgewiesen werden [34,52].

Somit sind alle bisher bekannten Virulenzdeterminanten auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert. Die Shiga Toxin-Gene liegen auf temperenten, lambdoiden Bakteriophagen, die genetische Information für die "attaching and effacing"-Läsionen liegt auf einer Pathogenitätsinsel im EHEC-Chromosom und zusätzliche Virulenzfaktoren werden von Genen auf Plasmiden kodiert [30,50,52,65].

So trägt das Plasmid pO157 die genetische Information für ein porenbildendes Zytotoxin, das sogenannte EHEC-Hämolyysin [12,65]. Ebenso kodiert pO157 für eine bifunktionale Katalase-Peroxidase (KatP) [66]. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß pO157 auch für ein komplexes Typ II-Sekretionssystem (Etp) codiert, das bei vielen pathogenen Bakterien für die Ausschleusung von Virulenzfaktoren verantwortlich ist. Die genaue Funktion des Typ II-Sekretionsystem bei EHEC muss allerdings noch geklärt werden. Außerdem ist pO157 für die Bildung eines sezernierten Proteins (EspP) von ca. 104 KDa verantwortlich [63,65]. Hierbei handelt es sich um eine Serinprotease, die einen Vertreter aus der Klasse der Auto-transporterproteine darstellt. Proteine dieser Familie tragen am C-terminalen Ende eine Domäne, die den Transport des Proteins durch die äußere Membran bewerkstelligt. Als mögliche Substrate konnten Pepsin und der humane Gerinnungsfaktor V identifiziert werden. Da ein Mangel an Faktor V zu einer verzögerten Blutgerinnung führt, könnte EspP zur Verstärkung der Darmblutungen beitragen, die bei Infektion mit EHEC auftreten können. Dafür spricht ebenfalls, daß EspP bei 37°C und basischem pH-Wert exprimiert wird. Bedingungen, die denen im Colon des Menschen entsprechen.

Epidemiologische Untersuchungen, die nach dem Auftreten der ersten EHEC-Infektionen beim Menschen unternommen wurden, führten zur Entdeckung des natürlichen Reservoirs der Krankheitserreger. Hierbei handelt es sich um landwirtschaftliche Nutztiere, primär Rinder, die EHEC in ihrem Kot ausscheiden [3,10]. Auffälligerweise zeigen Rinder und andere Wiederkäuer, die diese Bakterien ausscheiden, gewöhnlich keine Anzeichen einer Erkrankung und können äußerlich als Keimträger nicht erkannt werden [9].

Die Übertragungsmöglichkeiten auf den Menschen sind zahlreich. Die große Umweltstabilität und die gute Überlebensfähigkeit der EHEC in saurem Milieu erklärt die niedrige Infektionsdosis von ca. 10^2 Keimen [5,18]. Die Infektion des Menschen erfolgt primär über kontaminierte Lebensmittel, besonders durch nicht ausreichend erhitztes Rindfleisch, sowie durch Rohmilch von Rind und von der Ziege [16]. Von Bedeutung sind ebenfalls fäkal-orale

Übertragungswege. Das ist besonders für Gemeinschaftseinrichtungen epidemiologisch zu beachten [14]. Auch sind Tier-Mensch-Kontakte als Übertragungsweg mittels einer Schmierinfektion möglich [15]. Selbst rohes Gemüse und Obst gilt, wenn organischer Dünger im Gartenanbau verwendet wird, als potentieller Risikofaktor. So wurden EHEC in frisch gepreßtem und nicht-pasteurisierten Apfelsaft nachgewiesen [2,20].

Die Behandlung der durch STEC hervorgerufenen Krankheitsbilder erfolgt symptomatisch. In der Regel sind die durch die Bakterien hervorgerufenen Durchfallerkrankungen selbst-limitierend und heilen nach 6-10 Tagen ohne Residuen ab [3,5,17]. Das Verabreichen von Antidiarrhoika sollte bei blutigen Durchfällen vermieden werden [22], da durch sie das Risiko, ein hämolytisch-urämisches Syndrom zu entwickeln, wie auch das Auftreten neurologischer Symptome, begünstigt wird [13,23,24,27,59].

Auch ist die Wirksamkeit einer frühen Antibiotikatherapie zur Vorbeugung gegen das hämolytisch-urämische Syndrom nach wie vor unklar [19,20,21]. So zeigten eine prospektive, wie auch zwei retrospektive Studien eine Verschlechterung des Krankheitsbildes durch das Verabreichen von Antibiotika. Dagegen konnte in einer weiteren retrospektiven Analyse eine deutliche Verbesserung des Krankheitsverlaufes durch eine Antibiotikatherapie erreicht werden. Das Verabreichen von Antibiotika kann demnach den Krankheitsverlauf, als auch das Risiko Komplikationen zu entwickeln, verschlimmern. Andererseits scheinen die Vorteile, beziehungsweise Nachteile einer Antibiose, stark von dem verabreichten Chemotherapeutikum, seiner Dosierung und dem Infektstadium des Patienten abzuhängen [20]. Ebenso ist das Risiko der Patienten stark erhöht, ein hämolytisch-urämisches Syndrom zu entwickeln, wenn ein Antibiotikum verabreicht wird, gegen das sich der STEC-Stamm resistent zeigt [51]. Darüberhinaus scheint es bei EHEC stammspezifische Unterschiede bezüglich der Toxinfreisetzung zu geben, wenn diese subtherapeutischen Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt sind. So wurde sowohl über eine erhöhte Toxinfreisetzung, als auch über ein Rückgang der Toxinfreisetzung unterschiedlicher EHEC Stämme auf das gleiche Antibiotikum berichtet [39]. In Anbetracht der möglichen Verschlechterung des Krankheitsbildes stellen sowohl Antibiotika als auch Antidiarrhoika bei einer nachgewiesenen STEC-Infektion nach den neusten Empfehlungen der „Infectious Diseases Society of America“ (IDSA) eine Kontraindikation dar [13,40,55,59].

Obwohl die Bakterienstämme demnach nicht unter selektiven Druck beim Menschen stehen, wird weltweit von einer zunehmenden Antibiotika-Resistenzentwicklung bei EHEC berichtet

[25,26,27,28,29]. Ein Grund hierfür könnte im Selektionsdruck liegen, der durch den therapeutischen und paratherapeutischen Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung gefördert wird [71]. Seit vielen Jahren werden neben den therapeutischen, gegen Infektionserreger gerichteten Einsatz, Antibiotika auch in subtherapeutischen Dosen als sogenannte antibakterielle Leistungsförderer eingesetzt [71]. Ein Teil der Länder verbraucht mehr als 50% der eigenen Antibiotika-Produktion in der Landwirtschaft [72].

So werden seit den fünfziger Jahren Antibiotika in niedrigen Dosierungen als Leistungsförderer dem Futter von Masttieren beigemischt. Diese Maßnahme beruht auf der Entdeckung, daß gewisse Antibiotika eine signifikant bessere Futterverwertung bewirken, die Gewichtszunahme beschleunigen, sowie die Häufigkeit von Krankheitsfällen in Mastbetrieben reduzieren. Antibiotikadosierungen von maximal 100 mg pro kg Futter genügen, um die genannten Wirkungen sowie einen um 3-15 % höheren Betriebsgewinn zu erzielen [31].

Daneben werden in der Tierhaltung auch weiterhin, in nicht unerheblichem Umfang, Antibiotika zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. In einer Studie wurde nachgewiesen, daß allein der therapeutische Einsatz von Antibiotika in einer Milchviehanlage ausreicht, den Anteil mehrfachresistenter koliformer Keime, gemessen an der Gesamtzahl koliformer Keime, auf über 10% zu erhöhen [67].

Nicht zuletzt ist der Grund der zunehmenden Resistenzen bei Krankheitserregern auch in der Humanmedizin zu suchen. Aktuelle Untersuchungen zeigen, daß häufig bei mehr als 30% aller Krankenhauspatienten Antibiotika eingesetzt werden. Somit gehören Antibiotika in der Klinik zu den meist verwendeten Arzneimitteln. Diese Zahl weist schon auf den enormen Selektionsdruck hin, der durch die Antibiotikatherapien auf bakterielle Infektionserreger im Krankenhaus ausgeübt wird [67].

Der Gebrauch von Antibiotika führt jedoch in jedem Ökosystem zur Selektion resistenter Bakterien. Das trifft für alle Anwendungen in der Therapie, der Prophylaxe oder der Verabreichung als Leistungsförderer zu. Besonders die in der Tiermast verabreichten „Low-level“-Konzentrationen und die Langzeitexposition bergen ein hohes Risiko der Resistenzentwicklung [72]. So können die Auswirkungen der jahrelangen Anwendung von Antibiotika in der Tierzucht zur Selektion resistenter Bakterien bei Masttieren führen. Hier wiederum besteht die Gefahr des Transfers von resistenten Erregern auf den Menschen durch direkten Kontakt mit Tieren oder mittels kontaminierter Nahrungsmittel. Die Übertragung

von Resistenzgenen auf humane Erreger und somit der Anstieg der Inzidenz von Infektionen mit resistenten Krankheitserregern beim Menschen kann die Folge sein [72].

Gefahr hierbei ist die Tatsache, daß es die Ärzte bei der therapeutischen Anwendung von Antibiotika mit zunehmenden multiresistenten Krankheitserregern zu tun haben. Eine Ursache könnte in der Bildung von Kreuzresistenzen liegen, die durch die Verfütterung von Antibiotika an Masttiere gefördert werden, die ebenso in der Humanmedizin angewendet werden. Bis heute konnte bei einer Vielzahl von Krankheitserregern ansteigende Antibiotikaresistenzen beobachtet werden, wodurch der Einsatz von Antibiotika in der Tiermast wieder erneut in Diskussion gerät.

So konnte eine Zunahme der Antibiotikaresistenz bei EHEC-Bakterien in Italien [25], Nord Amerika [26,27], Groß Britannien [28] und Chile [29] beobachtet werden. Ratnam et al. [20] konnten beispielsweise bei 2,9% von 174 *E. coli* O157 Stämmen Resistenzen gegen Antibiotika nachweisen. Farina et al. [25] zeigten, daß 12/15 *E. coli* O157 Stämme empfindlich gegenüber den getesteten Antibiotika war, allerdings konnten bei nur 2/15 non-O157 STEC eine Antibiotikaempfindlichkeit nachgewiesen werden. Die meisten der untersuchten non-O157 STEC konnten ihre Resistenzen auf den *E. coli* K-12-Stamm mittels Konjugation übertragen. Allerdings war es keinem der O157 Stämme möglich seine Resistenzen zu übertragen.

In einer Arbeit von Kim et al. [27] wurden 176 *E. coli* O157:H7 Stämme, die zwischen 1989 und 1991 isoliert wurden, auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit hin untersucht. 7,4% der isolierten Stämme zeigten Resistenzen gegen Streptomycin, Sulfisoxazole und Tetracyclin. Dagegen konnte bei 56 STEC-Stämmen, die zwischen 1984 und 1987 isoliert wurden, keinerlei Resistenzen gegenüber Antibiotika nachgewiesen werden [27].

Prado et al. [29] untersuchten 83 EHEC Stämme, die von Patienten mit HUS und Diarrhö isoliert wurden. 4 % waren resistent gegen Tetracyclin, 5 % gegen Chloramphenicol, 24 % gegen Cotrimoxazol und 25 % gegen Ampicillin.

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen einer infektionsepidemiologischen Studie, alle STEC-Stämme, die sowohl von Patienten, als auch von asymptomatischen Ausscheidern 1996 in Würzburg isoliert wurden, zu charakterisieren und hinsichtlich ihres Antibiotika-Resistenzprofils zu untersuchen. Mittels des Agardiffusionstest wurde bestimmt, ob sich die Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* Isolate sensibel gegenüber einer Reihe von Antibiotika, die routinemäßig in der Behandlung gramnegativer Infektionen angewendet werden, zeigen. Zu

den untersuchten Antibiotika zählten die β -Laktam Antibiotika Ampicillin, Piperacillin, Cefotaxim, Cefoxitin, Cefotiam und Imipenem, die Aminoglykoside Gentamicin und Streptomycin, die Gyrasehemmer Ofloxacin und Ciprofloxacin, sowie Tetracyclin, Chloramphenicol und die Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol. Um zu überprüfen, ob die resistenten STEC-Isolate einen hohen Resistenzstatus oder eher einen niedrigen Resistenzstatus aufwiesen, wurde deren minimale Hemmkonzentration (MHK) mit dem Etest[®] bestimmt. Weiter sollte mit Konjugationsversuchen geklärt werden, ob die Resistenzen auf andere *E. coli* Stämme übertragbar sind, also auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert sind.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

A	Ausscheider
AB	Antibiotika
AMP	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
C	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
CN	Gentamicin
CTM	Cefotiam
CTX	Cefotaxim
D	Diarrhö
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	2'-Desoxynucleosidtriphosphat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
FOX	Cefoxitin
g	Gramm
h	Stunde
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IMP	Imipenem
LB	Luria Bertani Medium
l	Liter
mM	Millimolar
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
NAL	Nalidixinsäure
OD	optische Dichte

OFX	Ofloxacin
PRL	Piperacillin
R	Resistent
RT	Raumtemperatur
S	Sensibel
SDS	Natrium-Laurylsulfat
ST	Streptomycin
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin (Proteinbezeichnung)
stx	Shiga Toxin (Genbezeichnung)
SXT	Cotrimoxazol
TTP	Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura
TET	Tetracyclin
U/min	Umdrehung pro Minute
ÜNK	Übernachtskultur
w/v	Gewicht/Volumen

2.2. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten STEC wurden im Rahmen der Diagnostik im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg im Jahre 1996 isoliert und für die Untersuchungen aus Stammkonserven angezogen. Hierzu wurden LB-Agarplatten (siehe 2.3.1.) mit einer Impföse aus Nähragarstichkulturen beimpft und bei 37°C bebrütet.

Insgesamt wurden 144 STEC-Stämme untersucht. Zur Anzucht in Flüssigkultur wurden Bakterien von der Agarplatte mit einer Impföse in LB-Medium übertragen und unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Von 74 STEC-Stämmen der Serogruppe O157 wurden 27 von Patienten mit der klinischen Diagnose eines hämolytisch-urämischen Syndroms isoliert, 18 O157 STEC-Stämme konnten von Patienten mit Diarrhö gewonnen werden und 15 O157 STEC-Stämme stammten von asymptomatischen Ausscheidern. Von 70 non-O157 STEC, die außer den Stämmen der Serogruppe O157 alle anderen aufgeführten Serogruppen einschließen, wurden 17 von Patienten isoliert, die ein hämolytisch-urämisches Syndrom aufwiesen. Vierundzwanzig non-O157 STEC-Stämme konnten von Patienten mit Diarrhö gewonnen werden und insgesamt 29 non-O157 STEC-Stämme stammten von asymptomatischen Ausscheidern.

Als Positiv- und Negativkontrollen beim Nachweis des *stx*-Genotyps von STEC mittels der Polymerasekettenreaktion dienten die STEC-Stämme EDL 933 (*stx*₂⁺), E32511 (*stx*_{2c}⁺) und der *E. coli* K12 Laborstamm C600 (*stx*⁻). Für die Konjugationsversuche wurde der *E. coli* Laborstamm DH5α als Rezipient verwendet.

2.3. Kulturmedien

2.3.1. LB-Medium

Trypton	10,0	g/l
Hefeextrakt	5,0	g/l
NaCl	10,0	g/l

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,5 eingestellt. Zum Herstellen von festen Nährböden wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 15,0 g/l Agar beigemischt. Für alle aufgeführten Nährböden wurde deionisiertes Wasser verwendet.

2.3.2. TSB-Medium

Trypticase Pepton	17,0	g/l
Phytone Pepton	3,0	g/l
NaCl	5,0	g/l
K ₂ HPO ₄	2,5	g/l
Glucose	2,5	g/l

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,3 eingestellt.

2.4. Feste Nährböden

2.4.1. Müller-Hinton-Agar

Rinderextrakt	30,0	g/l
Casaminsäuren	17,9	g/l
Stärke	1,5	g/l
Bacto Agar	17,0	g/l

2.4.2. Blutagar

Zu 26,4 g "Tryptose blood agar base" (Oxoid Unipath Diagnostics GmbH, Wesel) wurden 760 ml deionisiertes Wasser zugegeben, anschließend wurde die Lösung autoklaviert und im Wasserbad auf 48-50°C abgekühlt.

In der Zwischenzeit wurden 40 ml defibriertes Schafsblut (Oxoid Unipath Diagnostics GmbH, Wesel) in einer Sigma Kühlzentrifuge mit 3000 U/min bei 4°C für 20 min zentrifugiert, der entstandene Überstand abpipettiert und verworfen. Das Erythrozytenpellet wurde nun in 15 ml Phosphat-gepufferter Saline (PBS) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension unter gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben, zentrifugiert und dann unter erneuter Zugabe von 15 ml PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde ebenfalls wiederholt. Bevor daraufhin die gewaschene Erythrozytensuspension in das Tryptose Blut Agar Medium eingerührt wurde, wurden dem Medium sterilfiltriertes CaCl₂ in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Je 20 ml des Mediums wurden unter einer Sterilbank in sterile Petrischalen gegossen.

2.4.3. Nähragar für StICKkulturen

Pepton	10,0	g/l
NaCl	3,0	g/l
Na ₂ HPO ₄	2,0	g/l
Fleischextrakt	5,0	g/l
Agar	15,0	g/l

Das Medium wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.4.4. Sorbit-MacConkey-Agar

Pepton	20,0	g/l
Sorbit	10,0	g/l
Gallensalzmischung	1,5	g/l
NaCl	5,0	g/l
Neutralrot	0,04	g/l
Kristallviolett	0,001	g/l
Agar	15,0	g/l

2.5. Puffer und Lösungen

Für alle Puffer und Lösungen wurde Aqua dest. verwendet.

2.5.1. Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

NaCl	10,0	g/l
KCl	0,25	g/l
KH ₂ PO ₄	0,25	g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,8	g/l

2.5.2. Elektrophoresepuffer

TAE-Puffer 10-fach

Tris-Base	48,5	g/l
Na-Acetat	27,2	g/l
EDTA- Na ₄	0,3	g/l

Der Elektrophoresepuffer wurde mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und für den Gebrauch 1:10 in bidestillierten H₂O verdünnt.

TBE-Puffer 10-fach

Tris-Base	108,5 g/l
Borsäure	55,8 g/l
EDTA-Na ₄	9,3 g/l

Auftragspuffer

Bromphenolblau	100 µl (Stammlösung 1% w/v)
Xylencyanol	100 µl (Stammlösung 1% w/v)
EDTA	50 µl (Stammlösung 0,5 M)
SDS	10 µl (Stammlösung 10% w/v)
	ad 1000 µl Glycerin (50 %)

2.5.3. Lösungen für die Plasmidpräparation (alkalische Lyse)

Lösung I

Glucose	5,0 ml (Stammlösung 50 mM)
Tris-HCl ph 8,0	2,5 ml (Stammlösung 25 mM)
EDTA ph 8,0	2,0 ml (Stammlösung 10 mM)
	ad 100 ml H ₂ O bidest.

Lösung II

NaOH	0,2 ml (Stammlösung 0,2 M)
SDS	1,0 ml (Stammlösung 1% w/v)
	ad 10 ml H ₂ O bidest.

Lösung III

K-Acetat	60,0 ml (Stammlösung 3M)
----------	---------------------------

Eisessig 11,5 ml (11,4%)

ad 100 ml H₂O bidest.

2.6. Antibiotika-Resistenzbestimmung mittels Agardiffusionstest

Beim Agardiffusionstest wurden mit Antibiotika getränkte Filterblättchen (AB Biodisk, Solna, Schweden) auf eine Agarplatte gelegt, die vorher gleichmäßig mit Bakterien ausgestrichen wurde. Nach dem Wachstum eines Bakterienrasens wurde anhand des Radius des entstandenen Hemmhofes die Resistenz der Keime bestimmt.

Zum Herstellen einer Keimsuspension wurden 3-5 Kolonien des entsprechenden Stammes in 4 ml Tryptose-Soja-Bouillon inokuliert und anschließend bei 37°C im Wasserbad für zwei bis drei Stunden inkubiert.

Die beimpfte Testbouillon wurde dann mit physiologischer Kochsalzlösung solange verdünnt, bis die Suspension gemäß der McFarland-Skala zur Trübungsmessung von Bakterien-suspensionen 0,5 entsprach. Zum Herstellen der Bariumsulfat-Trübungsreihe nach McFarland wurde eine 1% Lösung BaCl₂ (wasserfrei) und eine 1% (v/v) Lösung von H₂SO₄ (in Aqua dest.) verwendet.

Tabelle 1: Herstellung und Bewertung der Bariumsulfat-Verdünnungsreihe nach McFarland

Röhrchen-Nr.	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
H ₂ SO ₄ (ml)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
Bakterien/ml (x 10 ⁸)	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Anschließend wurde die Testbouillon mittels eines Wattetupfers auf Müller-Hinton (MH)-Agar im 60° Winkel gleichmäßig ausgestrichen. Zum Auflegen der mit Antibiotika getränkten Filterblättchen auf den MH-Agar wurden Dispenser (Oxoid Unipath Diagnostic GmbH, Wesel) verwendet, die bis zu 6 verschiedene Kartuschen à 50 Antibiotikatestblättchen enthielten. Durch Druck auf den Stempel wurden die Testblättchen auf die Platte aufgelegt und anschließend mit einer ausgeglühten Pinzette leicht angedrückt. Die Platten wurden innerhalb von 15 min nach Auflegen der Testblättchen in den Brutschrank gestellt und bei 37°C für 18 h inkubiert. Nach Wachstum des Bakterienrasens erfolgte das Ablesen der

entstandenen Hemmhöfe um die Antibiotikablättchen mit Hilfe von standardisierten Schablonen, die den Vorgaben des National Comitee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) entsprachen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in den Schablonen festgelegten sensiblen, mäßig empfindlich bzw. resistenten Bereiche. Die Bakterienstämme, die außerhalb dieser angegebenen Bereiche wuchsen, wurden als sensibel gewertet.

Bakterienstämme, die innerhalb der angegebenen Schablonengröße wuchsen, wurden als resistent gewertet. Als mäßig empfindliche Keime wurden solche bezeichnet, die zwischen den in den Schablonen angegebenen resistenten und sensiblen Bereichen wuchsen. Diese Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit ebenso als resistent gewertet.

Tabelle 2: Zusammenstellung der im Agardiffusionstest gemessenen Hemmhofdurchmesser und ihre Bewertung (nach NCCLS)

ANTIBIOTIKUM	Hemmhofdurchmesser	Bewertung
Ampicillin (AMP)	≤ 12-13 mm 12-13 mm > 13 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Piperacillin (PRL)	≤ 14-19 mm 14-19 mm > 19 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Cefotaxim (CTX)	≤ 15-22 mm 15-22 mm > 22 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Cefotiam(CTM)	≤ 16-19 mm 16-19 mm > 19 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Cefoxitin (FOX)	≤ 15-17 mm 15-17 mm > 17 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Imipinem (IMP)	≤ 13-15 mm 13-15 mm > 15 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Gentamicin (CN)	≤ 13-14 mm 13-14 mm > 14 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Streptomycin (ST)	≤ 9-11 mm 9-11 mm > 11 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Ciprofloxacin (CIP)	≤ 16-20 mm 16-20 mm > 20 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Ofloxacin (OFX)	≤ 16-19 mm 16-19 mm > 19 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Tetracyclin (TET)	≤ 15-18 mm 15-18 mm > 18 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Chloramphenicol (C)	≤ 13-17 mm 13-17 mm > 17 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel
Cotrimoxazol (SXT)	≤ 11-15 mm 11-15 mm > 15 mm	Resistent Mäßig resistent Sensibel

2.7. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der im Agardiffusionstest als "resistent" bestimmten Stämme erfolgte durch den Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Schweden).

Ein Etest[®] besteht aus einem dünnen, 5 mm breiten und 60 mm langem Plastikstreifen, auf dessen Oberfläche sich eine MHK-Ablese skala in µg/ml befindet. Auf der Unterseite des Streifens ist das getrocknete Antibiotikum so angebracht, daß es einen exponentiell abfallenden Konzentrationsgradienten bildet. Das Konzentrationsgefälle geht, abhängig vom Antibiotikum von 32 bis 0,002 µg/ml bzw. von 256 bis 0,016 µg/ml.

Das Prinzip des Etest[®] ist nun wie folgt: Nachdem, wie unter 2.8. beschrieben, eine Keimsuspension hergestellt wurde und diese bei 37°C für zwei bis drei Stunden im Wasserbad inkubiert wurde, erfolgte die Verdünnung der Bakteriensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung, bis die Bakterientrübung nach McFarland 0,5 entsprach. Die Testbouillon wurde dann mit einem Wattetupfer auf Müller-Hinton (MH)-Agar im 90° Winkel ausgestrichen. Anschließend wurde der Etest[®] auf den angetrockneten Bakterienrasen gelegt und mit einer ausgeglühten Pinzette leicht angedrückt. Innerhalb der nächsten 15 min nach Auflegen der mit Antibiotika getränkten Streifen wurden die Platten in den Brutschrank gestellt und bei 37°C für 18 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die durch das Bakterienwachstum um den Streifen gebildeten Hemmhöfe in Ellipsenform sichtbar. Die minimale Hemmkonzentration wurde anschließend von der Skala in µg/ml dort abgelesen, wo der ellipsenförmige Hemmhof endet und gleichzeitig den Etest[®]-Streifen schneidet.

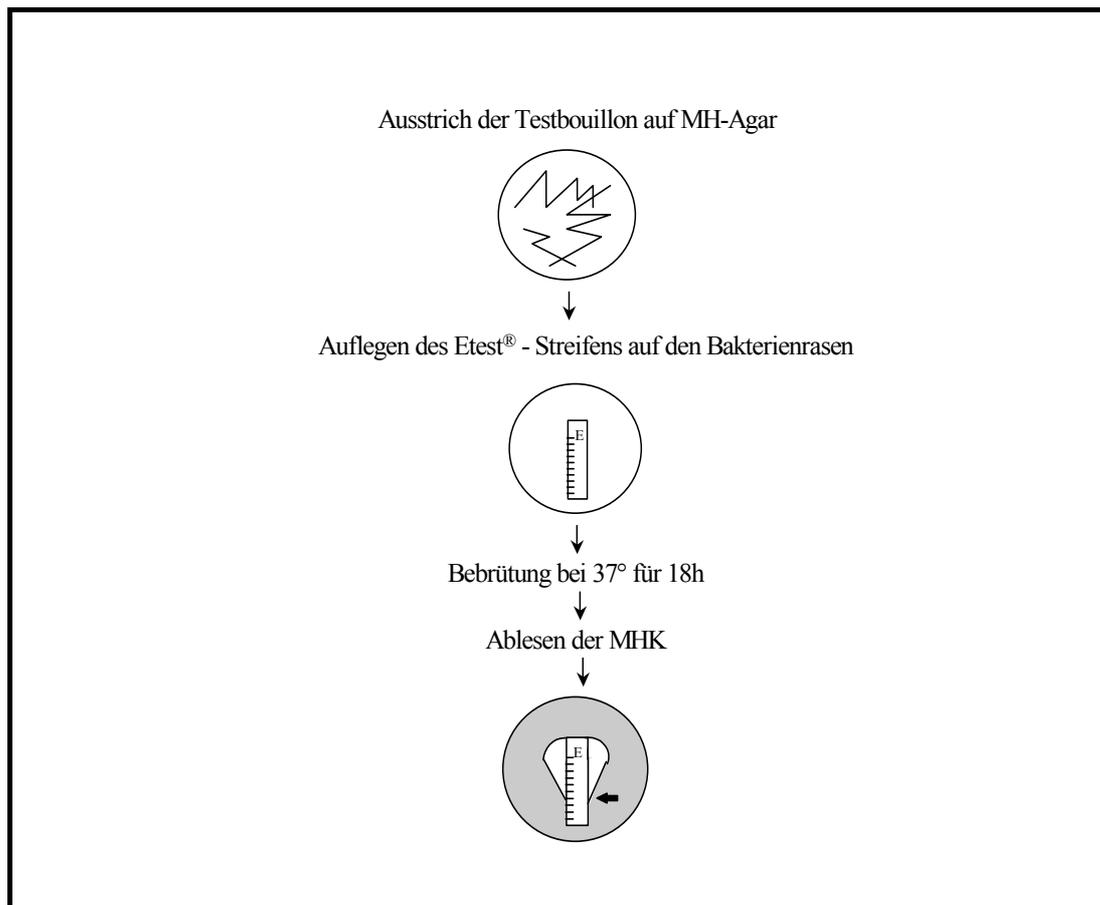


Abbildung 1: Schematische Darstellung der MHK-Bestimmung mit Etest®-Streifen

←: Ablesen der minimalen Hemmkonzentration

2.8. Übertragung von Antibiotikaresistenzen durch Konjugation

Die Konjugationsversuche wurden mit einer "Filter Konjugations Methode" durchgeführt. Hierbei wurden je 30 ml LB-Medium mit Übernachtskultur eines Donor-Stammes und eines Rezipienten-Stammes zu einer Anfangstrübung von $A_{600} = 0,1$ angeimpft und dann bei 37°C mit 180 U/min für weitere zwei bis drei Stunden bis zu einer Trübung von $A_{600} = 0,8$ bebrütet. Anschließend wurden 20 μl der Donorkultur und 80 μl der Rezipientenkultur vermischt und auf einen sterilen Nitrocellulosefilter getropft, der dann auf eine LB-Agarplatte aufgelegt wurde. Daraufhin wurden die Platten für 8 h bei 37°C inkubiert. Als Donorstämme dienten die untersuchten EHEC-Stämme, als Rezipient wurde ein Nalidixinsäure-resistenter *E. coli* DH5 α verwendet. Nach erfolgter Inkubation wurde der Filter mit einer sterilen Pipette abgenommen, in ein Reagenzröhrchen überführt, und die Bakterien durch Spülen mit 500 μl einer sterilen 10 mM MgSO_4 -Lösung vom Filter abgelöst und resuspendiert.

Zum Ausplattieren von je 100 µl unverdünnter Suspension, 1:10 verdünnter Suspension und 1:100 verdünnter Suspension wurden LB-Agarplatten verwendet, die 30 µg/ml Tetracyclin und 50 µg/ml Nalidixinsäure enthielten. Die mit Tetracyclin und Nalidixinsäure versetzten Nährböden sicherten das alleinige Wachstum solcher Stämme, die mittels Konjugation ihre Tetracyclinresistenz in den Nalidixinsäure resistenten *E. coli* DH5α-Stamm übertragen konnten.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 36 h wurden die Transkonjuganten selektiert und erneut auf frischen mit Tetracyclin und Nalidixinsäure supplementierten Agarplatten ausgestrichen. Als Negativkontrolle dienten sowohl der Donor-Stamm als auch der Rezipient, die beide ebenfalls auf mit Tetracyclin und Nalidixinsäure versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen wurden. Als Positivkontrolle wurde eine Kultur des entsprechenden Donor-Stammes auf Sorbit MacConkey-Agar geimpft.

2.9. Herstellung eines Nalidixinsäure-resistenten *E. coli* Stammes

Ein Nalidixinsäure-resistenter *E. coli* DH5α-Stamm wurde durch Selektion spontaner Mutanten stufenweise hergestellt. Dreißig ml LB-Medium, versetzt mit 5 µg/ml Nalidixinsäure, wurden mit einer frischen Übernachtskultur des *E. coli* Laborstammes DH5α angeimpft und über Nacht bebrütet. Dann wurden mittels einer Impföse Bakterien entnommen, auf eine Agarplatte mit derselben Konzentration an Nalidixinsäure übertragen, und schließlich fraktioniert ausgestrichen um sicherzustellen, daß die Kulturen nicht kontaminiert wurden.

Dieser Vorgang wurde mit Nalidixinsäurekonzentrationen von 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml wiederholt, bis es zur Isolierung einer Einzelkolonie kam, die resistent gegen 20 µg/ml Nalidixinsäure war und bei dieser Konzentration gutes Wachstum zeigte.

2.10. Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von EHEC

Der Nachweis von *stx*-Genen der STEC, die für eine Toxinuntereinheit oder deren Subtypen kodieren, wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zur Amplifikation der DNA lagern sich spezifische Oligonukleotide (Primer) an die denaturierte, einzelsträngige DNA (Template) bei der für sie optimalen Bindungstemperatur (Annealingtemperatur).

Sie errechnet sich nach einer Faustformel $[4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})]-5^{\circ}\text{C}$. Nach Bindung der Primer an die komplementäre Sequenz des Templates synthetisiert die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase, ausgehend von dem freien 3' Ende der Primer, ein neues DNA-Fragment. Die hierfür nötigen dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) werden dem Ansatz zugegeben. Durch zyklische Wiederholung des dreistufigen Reaktionsablaufs, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Primer Extension, erfolgt die exponentielle Vervielfachung der Ziel-DNA.

2.11. Primer für die *stxB₁*-und *stxB₂*-PCR

stxB₁-Startprimer KS7

5'-CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA-3'

stxB₁-Endprimer KS8

5'-CCC GAA TCC AGC TAT TCT GAG TCA ACG-3'

stxB₂-Startprimer GK5

5'-ATG AAG AAG ATG TTT ATG GCG-3'

stxB₂-Endprimer GK6

5'-TCA GTC ATT ATT AAA CTG CAC-3'

2.12. Reaktionsansatz zum PCR-Nachweis von *stx*-Genen

H ₂ O bidest.	27,0 µl
Bakteriensuspension (10 ⁶ Zellen/ml)	15,0 µl
10-fach Taq-Polymerase Puffer	5,0 µl
dNTP Mischung (Stammlösung 10 mM)	1,0 µl
Startprimer (30 pmol/µl)	1,0 µl
Endprimer (30 pmol/µl)	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (2U)	0,4 µl

Die Taq-DNA-Polymerase und der 10-fach konzentrierte Taq-Polymerase Puffer wurden von Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt, bezogen.

2.13. PCR-Programme zur Amplifikation von *stx*-Genen

stxB₁

94°C	45 sec
49°C	60 sec
72°C	45 sec
30 Zyklen	

stxB₂

94°C	45 sec
52°C	60 sec
72°C	45 sec
30 Zyklen	

2.14. Agarosegelelektrophorese

Zur Auswertung von PCR-Amplifikationsreaktionen wurden Agarosegele in einer Konzentration von 0,6-1 % (w/v) verwendet. Hierzu wurde die Agarose abgewogen, mit einer entsprechenden Menge TBE- oder TAE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle so lange aufgeköcht, bis eine homogene Suspension entstand. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Agarosegel auf einen waagrecht positionierten Gelschlitten ausgegossen und am oberen Ende mit einem Teflonkamm versehen, der als Taschenformer diente. Nachdem das Gel nach etwa 20-30 min vollständig auspolymerisiert war, wurde der Teflonkamm entfernt. Dann wurde der Gelschlitten in die Gelkammer gelegt und mit 0,5-fachen TAE- oder TBE-Puffer überschichtet. Anschließend wurden die Proben mit einem Auftragspuffer (Farbmarker) gemischt und in die präformierten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 V/cm bis die erste Farbfront des DNA-Farbmarkers ca. das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Daraufhin wurde das Gel für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und abschließend unter einem UV-Transilluminator analysiert.

2.15. Differenzierung zwischen *stx₂* und *stx_{2c}*

Da mit den Primern GK5 und GK6 sowohl *stxB₂* als auch die Variante *stxB_{2c}* amplifiziert werden, mußte der *stx₂* Genotyp durch eine nachfolgende Restriktion der Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *HaeIII* und *FokI* differenziert werden. Das *stxB₂* Gen wird durch *FokI* in zwei Fragmente von 116 bp und 154 bp geschnitten, *stxB_{2c}* bleibt unverdaut. Schneidet man hingegen mit *HaeIII*, so wird das Variantengen *stxB_{2c}* in ein 128 bp und ein 142 bp Fragment geschnitten, *stxB₂* bleibt unverdaut. Durch nachfolgende Agarosegelelektrophorese kann auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte der restringierten Fragmente zwischen *stxB₂* und *stxB_{2c}* unterschieden werden.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis des *stx*-Genotyps von STEC mittels Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der PCR wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme zunächst auf ihren *stx*-Genotyp hin untersucht. Es wurden sowohl *stxB₁*- als auch *stxB₂*-spezifische Primer verwendet (siehe 2.12.). Um zwischen *stxB₂* und *stxB_{2c}* zu unterscheiden, wurden die Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *Hae*III und *Fok*I geschnitten (siehe 2.15). Die erhaltenen PCR-Produkte der STEC-Stämme wurden in Agarosegelen aufgetrennt und analysiert.

Insgesamt wurden 74 STEC-Stämme der Serogruppe O157 untersucht. Zwei dieser Stämme waren *stx₁*-positiv. Daneben konnten 40 *stx₂*-positive STEC-Stämme der Serogruppe O157 nachgewiesen werden. Weitere 32 STEC-Stämme der Serogruppe O157 trugen zwei Toxingene. Hierbei wurden die Toxin-Genkombinationen *stx₁/stx₂*, *stx₁/stx_{2c}* und *stx₂/2c* gefunden. Bei den non-O157 STEC-Stämmen konnten 46 *stx₁*-positive Stämme bestimmt werden. Siebzehn non-O157 STEC-Stämme waren *stx₂*-positiv und bei weiteren sieben Stämmen wurden jeweils zwei Toxingene nachgewiesen. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten die STEC-Stämme EDL 933 (*stx₂⁺*), E32511 (*stx_{2c}⁺*) und der Laborstamm C600 (*stx⁻*). Die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen sind in den Tabellen 3,4,5 und 6 aufgeführt.

3.2. Nachweis der Antibiotikaempfindlichkeit von STEC-Isolaten von Patienten und Ausscheidern mit dem Agardiffusionstest

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das Antibiotikaresistenzspektrum der 144 STEC-Stämme mit dem Agardiffusionstest ermittelt. Zu den im Agardiffusionstest verwendeten Antibiotika zählten sowohl solche, die in klinischer Anwendung gegen gramnegative Keime stehen, als auch solche, die keine klinische Anwendung mehr finden. Alle STEC-Stämme wurden auf Resistenzen gegen die β -Laktam Antibiotika Ampicillin, Piperacillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefotiam und Imipenem, die Aminoglykoside Gentamicin und Streptomycin, die Gyrasehemmer Ofloxacin und Ciprofloxacin sowie Tetracyclin, Chloramphenicol, und die Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol getestet. Nach 18 h Bebrütung wurden die Hemmhofdurchmesser ausgemessen und die Empfindlichkeit anhand der Schablonen, die den Vorgaben des National Comitee for Clinical Laboratory Standard

(NCCLS) entsprachen, bestimmt. Die Tabellen 3-6 geben einen Überblick über die Charakteristika und Antibiotikasensibilität aller O157 und non-O157 STEC von Patienten und Ausscheidern.

Tabelle 3: Charakteristika und Antibiotikasensibilität von *E. coli* O157:H7/H⁻ Stämmen von Patienten und Ausscheidern

Stamm-Nr.	Serotyp	<i>stx</i> Genotyp	Klinik	Nachweis von Resistenzen gegen AMP/PRL/CTX/CTM/FOX/IMP/CN/ST/ CIP/OFX/TET/C/SXT
3010	O157:H7	<i>stx</i> _{2c}	D	-
3074	O157:H7	<i>stx</i> ₂	A	-
3075	O157:H7	<i>stx</i> ₂	A	-
3645	O157:H7	<i>stx</i> ₁	A	-
4010	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	A	-
4011	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	D	-
4232	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	A	-
4233	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	A	-
4597	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	D	-
4625	O157:H7	<i>stx</i> _{1/2}	D	-
5020	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	A	-
5407	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	D	-
5822	O157:H7	<i>stx</i> _{1/2}	A	-
5900	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	D	-
6216	O157:H7	<i>stx</i> _{2c}	D	-
6831	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	D	-
1938	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{2c}	D	-
1994	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	A	-
1996	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	A	-
2313	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	A	-
2473	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	A	-
2711	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	A	-
4299	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	D	-
4300	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	D	-
4304	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	D	-
4564	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	A	-
4992	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2}	D	TET^R
5028	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	A	-
5286	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	D	-
5531	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	D	-
5929	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	D	-
16110	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	D	-
16147	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	D	-

TET^R = Nachweis einer Tetracyclin-Resistenz; - = Sensibel.

Tabelle 4: Charakteristika und Antibiotikasensibilität von non-O157 STEC-Stämmen von Patienten und Ausscheidern

Stamm-Nr.	Serotyp	stx Genotyp	Klinik	AMP	PRL	CTX	CTM	FOX	IMP	CN	ST	CIP	OFX	TET	C	SXT
3967	O26:H11	stx ₁	A													
5157	O26:H11	stx ₁	D													
5236	O26:H11	stx ₁	D	R	R						R			R	R	
5499	O26:H11	stx ₁	D													
6153	O26:H11	stx ₁	D	R	R				R					R	R	
8399	O26:H11	stx ₁	D	R	R						R			R	R	
4141	O26:H ⁻	stx ₁	A													
4395	O26:H ⁻	stx _{1/2c}	A													
4817	O26:H ⁻	stx ₁	A													
6105	O26:H ⁻	stx ₁	D													
8574	O26:H ⁻	stx ₁	D	R	R									R	R	
6404	O26:H ⁻	stx ₁	A													
6481	O26:H ⁻	stx ₁	A													
7661	O26:H ⁻	stx ₂	D													
5380	O111:H ⁻	stx ₁	D								R			R		R
5579	O103:H2	stx ₁	A													
5721	O111:H2	stx ₁	D								R			R		
5727	O111:H2	stx ₁	D											R		
1858	O103:H2	stx ₁	D													
2905	O103:H2	stx ₁	D													
3381	O103:H2	stx ₁	D													
3386	O103:H2	stx ₁	A													
3390	O103:H2	stx ₁	A													
3391	O103:H2	stx ₁	A													
5577	O103:H2	stx ₁	D													
5714	O103:H2	stx ₁	D													
5726	O3:H10	stx ₁	A													

Stamm-Nr.	Serotyp	stx Genotyp	Klinik	AMP	PRL	CTX	CTM	FOX	IMP	CN	ST	CIP	OFX	TET	C	SXT
3204	O8:H	stx ₁	A											R		
6480	O8:H	stx _{2/2c}	A													
7139	O8:H	stx ₁	A													
7140	O8:H	stx ₁	D								R					
7617	O8:H2	stx ₂	A													
7619	O8:H2	stx ₂	A													
3432	O8:H14	stx ₂	A													
3757	O25:H	stx ₁	D													R
6561	O25:H14	stx ₁	D													
7793	O84:H	stx ₁	D											R		
4823	O104:H16	stx _{1/2c}	A													R
3759	O113:H4	stx ₂	A													
7395	O118:H	stx _{1/2}	D	R	R						R			R		
7940	O118:H	stx ₁	A													
3560	O128:H	stx ₁	A													
3378	O129:H	stx ₁	D													
5157 I	O145:H	stx ₂	D													
7465	O145:H	stx ₁	A													
7795	O145:H	stx ₁	A													
7879	O152:H4	stx ₁	A											R		
1867	ONT:H	stx ₁	D													
3558	ONT:H	stx ₁	A													
5155	ONT:H	stx ₁	A													
0071	ONT:H14	stx ₁	A													
2875	ONT:H14	stx ₁	A													
5021	Orau:H	stx ₂	A								R					

= Sensibel; **R** = Resistent.

Tabelle 5: Charakteristika und Antibiotikasensibilität von O157 STEC-Stämmen von Patienten mit der klinischen Diagnose HUS

Stamm-Nr.	Serovar	stx Genotyp	Klinik	Nachweis von Resistenzen gegen AMP/PRL/CTX/CTM/FOX/IMP/CN/ST/CIP/OFX/TET/C/SXT
0136	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
1104	O157:H7	<i>stx</i> ₁	HUS	-
3232	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	HUS	-
4049	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
4140	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
4366	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
4391	O157:H7	<i>stx</i> _{1/2}	HUS	-
4661	O157:H7	<i>stx</i> _{1/2c}	HUS	-
4797	O157:H7	<i>stx</i> _{1/2c}	HUS	-
4963	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
4996	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
5159	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	HUS	-
5459	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	HUS	-
5823	O157:H7	<i>stx</i> _{1/2}	HUS	-
5899	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	HUS	-
6334	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
6361	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
6648	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
6651	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	HUS	-
6830	O157:H7	<i>stx</i> _{2/2c}	HUS	-
7898	O157:H7	<i>stx</i> ₂	HUS	-
0296	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
1533	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
1575	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
1775	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
1885	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
1995	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
2260	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
2471	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
3072	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
3172	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
3816	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
3817	O157:H ⁻	<i>stx</i> _{1/2c}	HUS	-
5869	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
7006	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
7273	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
7325	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
7462	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
8054	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
15998	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-
16148	O157:H ⁻	<i>stx</i> ₂	HUS	-

- = Hemmhofdurchmesser zeigt Empfindlichkeit gegen diese verwendeten Antibiotika.

Tabelle 6: Charakteristika und Antibiotikasensibilität von non-O157 STEC-Stämmen von Patienten mit der klinischen Diagnose HUS

Stamm-Nr.	Serotyp	stx Genotyp	Klinik	AMP	PRL	CTX	CTM	FOX	IMP	CN	ST	CIP	OFX	TET	C	SXT
3639	O26:H11	<i>stx</i> ₂	HUS					R						R		R
6061	O26:H11	<i>stx</i> ₂	HUS													
5720	O26:H	<i>stx</i> ₂	HUS	R	R						R			R		
6068	O26:H	<i>stx</i> ₂	HUS													
7662	O26:H	<i>stx</i> ₂	HUS													
4417	O111:H	<i>stx</i> ₁	HUS											R		
4993	O111:H	<i>stx</i> ₂	HUS													
6037	O111:H	<i>stx</i> _{1/2}	HUS								R			R		
3985	O145:H	<i>stx</i> ₂	HUS	R	R						R			R		
4865	O145:H	<i>stx</i> _{2c}	HUS													
3651	O8:H19	<i>stx</i> ₁	HUS													
7382	O8:H2	<i>stx</i> ₂	HUS													
6833	O11:H2	<i>stx</i> ₂	HUS													
3642	O55:H	<i>stx</i> ₁	HUS													
9296	O77:H	<i>stx</i> _{2/2c}	HUS													
7792	O84:H	<i>stx</i> ₁	HUS											R		R
3942	O103:H2	<i>stx</i> ₂	HUS													

= Sensibel; **R** = Resistent.

Die Tabelle 7 zeigt eine Übersicht aller resistenten Stämme mit Resistenzmuster, *stx*-Genotyp und dem assoziierten Krankheitsbild.

Tabelle 7: Antibiotika-resistente STEC-Stämme von Patienten und Ausscheidern

Stamm	Serotyp	Stx	Krankheit	Resistenzprofil					
				TET	AMP	PRL	SXT	C	ST
4992	O157:H7	1,2	D	TET					
6037	O111:H-	1,2	HUS	TET					ST
4417	O111:H-	1	HUS	TET					
5380	O111:H-	1	D	TET					ST
5727	O111:H2	1	D	TET					
5721	O111:H2	1	D	TET					ST
8574	O26:H11	1	D	TET	AMP	PRL		C	
6153	O26:H11	1	D	TET	AMP	PRL		C	
5236	O26:H11	1	D	TET	AMP	PRL	SXT	C	ST
8399	O26:H11	1	D	TET	AMP	PRL		C	ST
5720	O26:H-	2	HUS	TET	AMP	PRL			ST
3204	O8:H-	1	A	TET			SXT		
7140	O8:H-	1	D						ST
7793	O84:H-	1	D	TET			SXT		
7792	O84:H-	1	HUS	TET			SXT		
3985	O145:H-	2	HUS	TET	AMP	PRL		C	ST
7395	O118:H-	1,2	D	TET	AMP	PRL			ST
5021	O _{rauh} :H-	2c	A						ST
7879	O152:H4	1	A	TET					

TET = Tetracyclin; AMP = Ampicillin; PRL = Piperacillin; SXT = Cotrimoxazol;
C = Choramphenicol; ST = Streptomycin.

Unter den 144 getesteten Stämmen wurden 19 Stämme gefunden, die gegen mindestens ein Antibiotikum resistent waren. Resistenzen gegen Cefotaxim, Ceftazidim, Imipenem, Gentamicin, Ofloxacin und Ciprofloxacin wurden in keinem der Stämme nachgewiesen (siehe Tabelle 7).

Von den 19 resistenten Stämmen wiesen sechs eine Resistenz gegen ein einzelnes Antibiotikum auf. Vier dieser Stämme waren gegen Tetracyclin und zwei gegen Streptomycin resistent. Sechs weitere Bakterienstämme waren gegen jeweils 2 Antibiotika resistent, wovon 3 dieser Stämme Resistenzen gegen Tetracyclin und gegen Streptomycin aufwiesen, die anderen 3 Stämme gegen Tetracyclin und Cotrimoxazol. Dreifachresistenzen wurden nicht gefunden. Bei vier Stämmen konnte eine Vierfachresistenz gegen Tetracyclin, Ampicillin, Piperacillin und Streptomycin nachgewiesen werden (Tabelle 7). Eine Fünffachresistenz gegen Tetracyclin, Ampicillin, Piperacillin, Streptomycin und Chloramphenicol zeigten zwei Stämme. Ein einziger Stamm war gegen alle sechs in der Tabelle angeführten Antibiotika resistent. Es war festzustellen, daß die meisten Stämme (n = 17) gegen Tetracyclin resistent waren.

Auffällig war auch die Assoziation des Resistenzprofils mit dem Serotyp. So zeigten zwei von drei Stämmen des Serotyps O111:H⁻ das gleiche Resistenzmuster. Bei beiden konnten Resistenzen gegen Tetracyclin als auch gegen Streptomycin nachgewiesen werden. Der dritte Stamm des Serotyps O111:H⁻ zeigte dagegen nur eine Resistenz gegen Tetracyclin. Weiterhin zeigten die beiden Stämme des Serovars O111:H2 übereinstimmende Resistenzen gegenüber Tetracyclin, jedoch war nur bei einem dieser Stämme eine Resistenz gegenüber Streptomycin nachweisbar. Von den in Tabelle 7 aufgeführten vier Stämmen des Serotyps O26:H11 zeigten zwei ein identisches Resistenzmuster gegen Tetracyclin, Ampicillin, Piperacillin und Chloramphenicol, ein weiterer führte eine zusätzliche Resistenz gegenüber Streptomycin. Dem vierten Stamm des Serotyps O26:H11 konnten Resistenzen gegenüber allen aufgeführten Antibiotika nachgewiesen werden. Bei den Stämmen des Serotyps O8:H⁻ konnten keine gemeinsamen Resistenzen gefunden werden. Dagegen wurden wieder bei den Stämmen des Serotyps O84:H⁻ gemeinsame Resistenzen gegenüber Tetracyclin und Cotrimoxazol gefunden.

Es zeigte sich, daß von den 19 resistenten Stämmen nur einer der Serogruppe O157 angehörte, die restlichen 18 dagegen zu den non-O157 Serotypen zählten.

Weiterhin zeigen die Daten, daß Antibiotika-resistente Stämme vor allem unter den Stx1-produzierenden Bakterien gefunden wurden, weniger bei Stx2-produzierenden Bakterien, oder solchen Stämmen, die beide Toxine bilden. Das am häufigsten mit den aufgeführten

resistenten Stämmen assoziierte Krankheitsbild stellte mit 11 Fällen die Diarrhö dar. Fünf Fälle waren mit HUS assoziiert und 3 Stämme stammten von asymptomatischen Ausscheidern.

3.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) verschiedener Antibiotika bei resistenten STEC-Stämmen mit Hilfe des Etest[®]

Um festzustellen, ob bei den resistenten Bakterienstämmen ein hoher Resistenzstatus vorliegt oder ob es sich um niedrige Resistenzen handelt, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) mit dem Etest[®] in µg/ml bestimmt. Das Ablesen der MHK erfolgte wie unter Abschnitt 2.9. beschrieben. Die MHK-Werte der 19 resistenten Stämme waren für fast alle Antibiotika sehr hoch.

Die Konzentrationsgradienten-Skala für Tetracyclin auf dem Etest[®]-Streifen reicht von 0,016 bis 256 µg/ml. Zehn der gegen Tetracyclin resistenten Stämme zeigten MHK-Werte von > 256 µg/ml. Der *E. coli* O111:H2 Stamm 5727, der *E. coli* O26:H11 Stamm 8574 und der *E. coli* O26:H Stamm 5720 erreichten den maximal ablesbaren Wert von 256 µg/ml. Auch der *E. coli* O111:H Stamm 5380 zeigte einen hohen MHK-Wert von > 192 µg/ml. Bei dem *E. coli* O152:H4 Stamm 7879 konnte ein MHK-Wert von 128 µg/ml abgelesen werden. Der *E. coli* O111:H2 Stamm 5721 und der *E. coli* O26:H111 Stamm 8399 erreichten mit dem MHK von 96 µg/ml den niedrigsten MHK-Wert für Tetracyclin. Alle gegen Ampicillin resistenten Stämme überstiegen den maximal ablesbaren Werte von > 256 µg/ml auf der Konzentrationsgradientenskala.

Dagegen zeigten die gegen Piperacillin-resistenten Stämme minimale Hemmkonzentrationen im Bereich von 24 bis 48 µg/ml. Der *E. coli* O26:H11 Stamm 5236 und der *E. coli* O145:H Stamm 3985 erreichten mit 24 µg/ml die niedrigsten MHK-Werte, gefolgt von dem *E. coli* O26:H11 Stamm 8399 und dem *E. coli* O118:H Stamm 7395 mit einem MHK-Wert von 32 µg/ml. Einen MHK-Wert von 48 µg/ml konnte bei dem *E. coli* O26:H11 Stamm 8574 und dem *E. coli* O26:H11 Stamm 6153 abgelesen werden. Den höchsten MHK-Wert erreichte der *E. coli* O26:H Stamm 5720 mit 64 µg/ml. Alle Cotrimoxazol-resistenten Stämme zeigten MHK-Höchstwerte von > 32µg/ml. Zu ihnen zählte der *E. coli* O26:H11 Stamm 5236, der *E. coli* O8:H Stamm 3204, der *E. coli* O84:H Stamm 7793 und der *E. coli* O84:H Stamm 7792. Für Chloramphenicol gibt der Etest[®] wiederum MHK-Werte von 0,016 bis 256 µg/ml an. Auch hier überstiegen alle 5 Chloramphenicol-resistenten Stämme, der *E. coli* O26:H11

Stamm 8574, der *E. coli* O26:H11 Stamm 6153, der *E. coli* O26:H11 Stamm 5236, der *E. coli* O26:H11 Stamm 8399 und der *E. coli* O145:H Stamm 3985 wiederum den maximal ablesbaren Wert von > 256 µg/ml an.

Bei Streptomycin, das ebenfalls eine Konzentrationsgradienten-Skala von 0,016 bis 256 µg/ml auf dem Etest[®]-Streifen besitzt, wiesen acht Stämme MHK-Werte von > 256 µg/ml auf. Zu ihnen zählten der *E. coli* O111:H Stamm 6037, der *E. coli* O111:H Stamm 5380, der *E. coli* O111:H2 Stamm 5721, der *E. coli* O26:H11 Stamm 5236, der *E. coli* O8:H Stamm 7140, der *E. coli* O145:H Stamm 3985, der *E. coli* O118:H Stamm 7395 und der *E. coli* O_{rough}:H. Der *E. coli* O26:H Stamm 5720 erreichte den maximal ablesbaren Wert von 256 µg/ml. Ein MHK-Wert von 46 µg/ml konnte bei dem *E. coli* O26:H11 Stamm 8399 abgelesen werden.

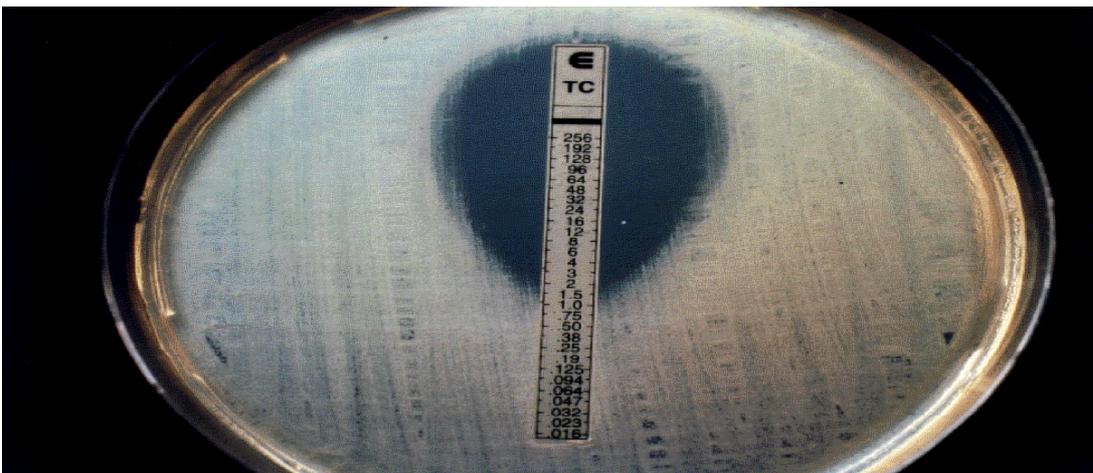
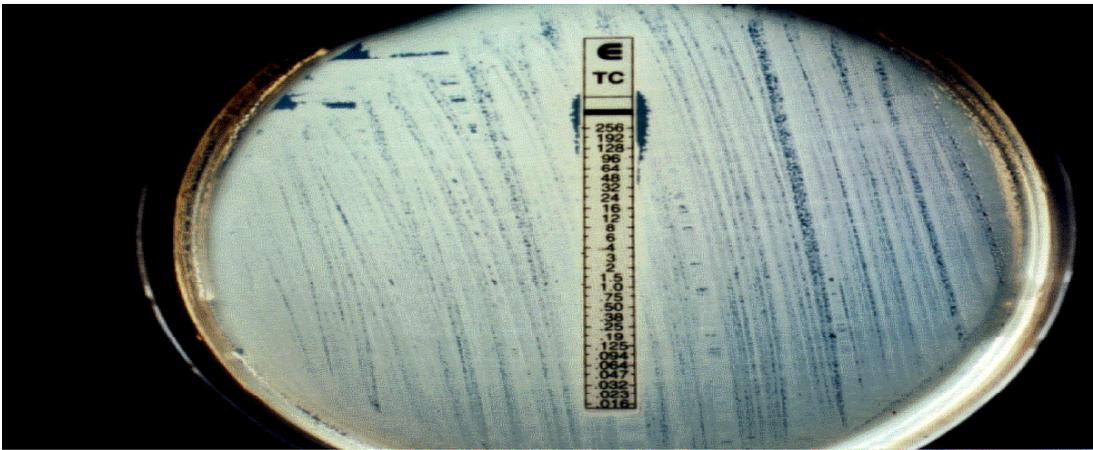
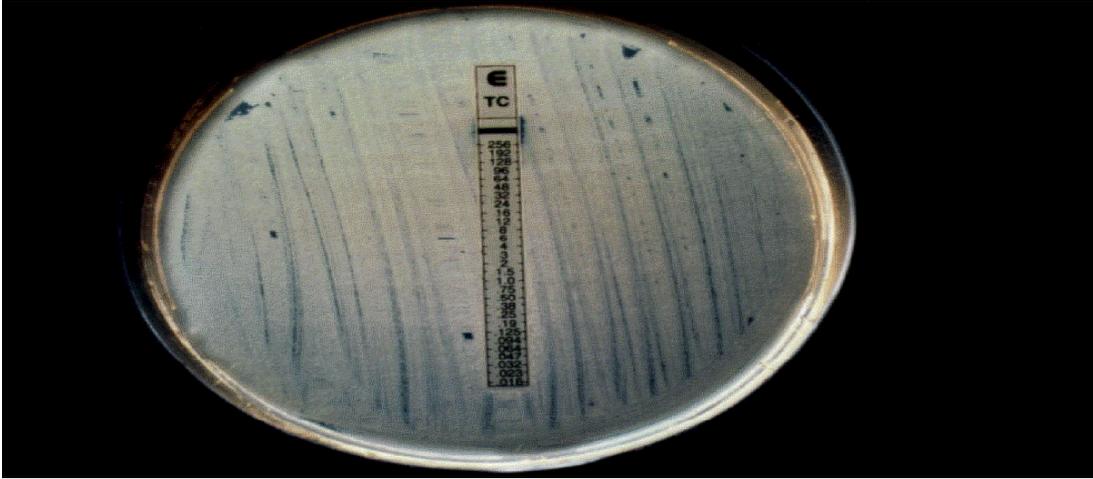


Abbildung 2: Bestimmung der MHK-Werte von Tetracyclin für die *E. coli* Stämme A) 3965 (O145:H); B) 7879 (O152:H4) und C) 8399 (O26:H11) mit Etest[®].

Die MHK für das Antibiotikum Tetracyclin von dem *E. coli* O145:H⁻ Stamm 3985 war größer als 259 µg/ml, die MHK für das Antibiotikum Tetracyclin von dem *E. coli* O152:H4 Stamm 7879 lag bei 128 µg/ml und die MHK für das Antibiotikum Tetracyclin von dem *E. coli* O26:H11 Stamm 8399 lag bei 96 µg/ml.

Tabelle 8: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen verschiedener Antibiotika bei resistenten STEC-Stämmen von Patienten und Ausscheidern

Stamm	Serotyp	Stx	Krankheit	MHK-Werte					
				TET	AMP	PRL	SXT	C	ST
4992	O157:H7	1,2	D	>256					
6037	O111:H ⁻	1,2	HUS	>256					>256
4417	O111:H ⁻	1	HUS	>256					
5380	O111:H ⁻	1	D	>192					>256
5727	O111:H2	1	D	256					
5721	O111:H2	1	D	96					>256
8574	O26:H11	1	D	256	>256	48		>256	
6153	O26:H11	1	D	>256	>256	48		>256	
5236	O26:H11	1	D	>256	>256	24	>32	>256	>256
8399	O26:H11	1	D	96	>256	32		>256	46
5720	O26:H ⁻	2	HUS	256		64			256
3204	O8:H ⁻	1	A	>256			>32		
7140	O8:H ⁻	1	D						>256
7793	O84:H ⁻	1	D	>256			>32		
7792	O84:H ⁻	1	HUS	>256			>32		
3985	O145:H ⁻	2	HUS	>256	>256	24		>256	>256
7395	O118:H ⁻	1,2	D	>256	>256	32			>256
5021	O _{rough} :H ⁻	2c	A						>256
7879	O152:H4	1	A	128					

TET = Tetracyclin; AMP = Ampicillin; PRL = Piperacillin; SXT = Cotrimoxazol;
C = Choramphenicol; ST = Streptomycin. MHK in µg/ml.

3.4. Übertragung von Antibiotika-Resistenzen

Um festzustellen, ob die Antibiotikaresistenzen durch Konjugation auf andere *E. coli* Bakterien übertragbar sind, wurden mit allen resistenten Stämmen Konjugationsversuche durchgeführt. Da 17 der als resistent bestimmten Stämme resistent gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin waren, wurde dieses Antibiotikum als selektiver Marker eingesetzt. Die ausgewählten 17 Tetracyclin-resistenten STEC-Stämme wurden mittels "Filterkonjugation" mit dem Nalidixinsäure-resistenten Rezipienten *E. coli* DH5 α gekreuzt (siehe 2.9). Nach der Konjugation wurde der Konjugationsmix auf Selektionsplatten mit Tetracyclin und Nalidixinsäure ausgestrichen. Lediglich bei 4 der 17 Konjugationsexperimente konnten Transkonjuganten durch Wachstum auf den Selektionsplatten gefunden werden.

Um zu überprüfen, ob neben der Tetracyclin-Resistenz weitere Antibiotikaresistenzen auf den Nalidixinsäure-resistenten *E. coli* DH5 α -Stamm übertragen wurden, wurden die Nährböden mit dem entsprechenden Antibiotika versetzt (siehe Tabelle 9).

So wurde bei dem *E. coli* O26:H α Stamm 5720 und dem *E. coli* O26:H11 Stamm 8399 neben den mit Tetracyclin und Nalidixinsäure versetzten Agarplatten solche angefertigt, die zusätzlich noch Ampicillin oder Piperacillin enthielten. Der *E. coli* O118:H α Stamm 7395 wurde auf Grund seines Resistenzmuster neben den mit Ampicillin und Piperacillin angereicherten Nährböden zusätzlich noch auf mit Streptomycin versetzten Agarplatten ausgestrichen. Dagegen reichte bei dem *E. coli* O152:H4 Stamm 7879 das alleinige Ausstreichen auf Nalidixinsäure und Tetracyclinsäure angereicherten Nährböden.

Bei Wachstum der Transkonjuganten auf dem mit Antibiotika versetzten Nährböden wurde von einer Übertragung der jeweiligen Antibiotikaresistenz ausgegangen.

Der *E. coli* O26:H α Stamm 5720 konnte all seine Resistenzen, nämlich gegen Tetracyclin, Ampicillin und Piperacillin im Konjugationsversuch übertragen. Dagegen konnte der multiresistente *E. coli* O118:H α Stamm 7395 nur seine Tetracyclin-Resistenz weitergeben. Der *E. coli* O26:H11 Stamm 8399 war in der Lage auf seine Transkonjugante neben Tetracyclin ebenfalls Ampicillin und Piperacillin, nicht jedoch Chloramphenicol und Streptomycin weiterzugeben. Der einfach-resistente *E. coli* O152:H4 Stamm 7879 übertrug seine Tetracyclinresistenz.

Tabelle 9. Übertragung von Antibiotika-Resistenzen von STEC Donor-Stämmen auf den Rezipienten *E. coli* DH5 α

Stamm	Amp	Prl	Tet	Sxt	C	St
5720	R	R	R	S	S	S
TK-5720	R	R	R	S	S	S
7395	R	R	R	S	S	R
TK-7395	S	S	R	S	S	S
7879	S	S	R	S	S	S
TK-7879	S	S	R	S	S	S
8399	R	R	R	S	R	R
TK-8399	R	R	R	S	S	S

TK- = Transkonjugante; R = Resistent; S = Sensibel.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß 12,9% aller untersuchten STEC-Stämme, die im Jahr 1996 in Würzburg von Patienten und asymptomatischen Ausscheidern isoliert wurden, mindestens eine Resistenz gegen die getesteten Antibiotika aufweisen. Bei genauerer Betrachtung konnte man feststellen, daß lediglich 1/74 O157 STEC-Stämmen eine Antibiotikaresistenz aufwies, im Vergleich zu 18/70 non-O157 STEC-Stämmen. Resistenzen wurden häufiger bei Stx1-produzierenden Bakterienstämmen (13/19) gefunden, seltener bei Stx2-produzierenden Stämmen oder solchen, die beide Toxine bilden. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Farina et al. [25] und Prado et al. [29] überein, die jeweils die Antibiotikaempfindlichkeit bei EHEC-Stämmen in Italien und Chile untersucht hatten.

Als Reservoir der humanpathogenen Shiga Toxin-produzierenden *E. coli*-Bakterien gelten landwirtschaftlich genutzte Tiere, insbesondere Rinder und Kälber, aber auch Schafe und Ziegen, sowie Lebensmittel wie Fleisch- und Milchprodukte [2,5]. Insgesamt konnten bereits mehr als 190 STEC Serotypen von Rindern und kleineren Wiederkäuern isoliert werden [32]. Die Aufmerksamkeit vieler bisheriger Studien richtete sich vor allem auf die Antibiotikaempfindlichkeit von STEC-Stämmen des Serotyps O157:H7, der weltweit als wichtigster Erreger des enteropathischen hämolytisch-urämischen Syndroms und der hämorrhagischen Colitis gilt [9]. Dies führte zur Unterschätzung der non-O157 STEC-Stämme, deren Beteiligung an schweren Krankheitsbildern mehr und mehr zunimmt [11,20]. In dieser Studie wurde die Mehrzahl der Antibiotikaresistenzen bei non-O157 Stämmen gefunden, die bei Rindern allgemein häufiger nachgewiesen werden. Somit könnte man vermuten, daß die Resistenzen ihren Ursprung bei landwirtschaftlichen Nutztieren finden.

Tatsächlich werden weltweit Antibiotika in der Tierfütterung als sogenannte Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt, was pro Jahr und Land viele Tonnen dieser hochwirksamen Therapeutika ausmacht [39]. Sie werden vornehmlich zur Prophylaxe und Therapie von bakteriell bedingten Bestandserkrankungen sowie zur Streßprophylaxe eingesetzt. Hierbei werden insgesamt mehr Antibiotika angewendet als zur medikamentösen Therapie in der Humanmedizin [35]. Dieser quantitativ und qualitativ sehr umfangreiche Einsatz von Antibiotika bedingt einen erheblichen Selektionsdruck auf alle empfindlichen Infektionserreger, aber auch auf die normale Bakterienflora in der Umgebung von Mensch und Tier. Die Bakterienarten entgehen diesem Selektionsdruck nur, indem sie resistente

Varianten bilden [33]. Somit wird das Zufüttern subtherapeutischer Antibiotikakonzentrationen als Wachstumsförderer als einer der Gründe für die ansteigenden Antibiotikaresistenzen bei koliformen Krankheitserregern gesehen [33,35]. Da wiederum das menschliche und tierische mikrobiologische Ökosystem stark miteinander verbunden ist [35], kann es sowohl durch Tierkontakt mittels Schmierinfektion, als auch über den Verzehr von Fleisch zu Übertragungen von Antibiotikaresistenzen auf den Menschen kommen [53].

In Ostdeutschland beispielsweise wurde von 1983 bis 1990 Nourseothricin, das strukturell dem Oxytetracyclin verwandt ist, als Wachstumsförderer angewendet [35]. Vor 1983 konnte man keine Resistenzen gegen dieses Antibiotikum bei *E. coli*-Bakterien der menschlichen und tierischen Darmflora nachweisen. Bereits zwei Jahre später gelang es resistente *E. coli*-Bakterien sowohl von der Darmflora der Tiere, als auch aus deren Fleischprodukten zu isolieren. Im Jahre 1990 wurden dann Resistenzen gegen Nourseothricin bei *E. coli*-Bakterien, die von den Tierzüchtern, ihren Familien und Mitgliedern ihrer Gemeinde isoliert wurden, nachgewiesen [35]. Ähnliche Beobachtungen konnten Mikrobiologen aus Holland machen, die Tierfarmen untersuchten, in denen Antibiotika als Leistungsförderer angewendet wurde. Hier konnten sie nicht nur eine große Anzahl resistenter Bakterien in den Kotproben feststellen, sondern auch, daß die Tierpfleger und die Schlachter, die in engem Kontakt mit den Tieren standen, Träger der gleichen resistenten Bakterien waren [53].

Der übermäßige Einsatz von Antibiotika in der Tiermast bedingt also, daß die residente Mikroflora der Tiere als sogenannter „Genpool“ fungieren kann, der genetisch determinierte Antibiotikaresistenzen aufweist. Diese können durch horizontalen Gentransfer sowohl auf apathogene, ubiquitär vorkommende Bakterienspezies als auch auf pathogene Keime während deren temporären Kolonisation übertragen werden [36,70].

Die eigentliche Problematik besteht nun vornehmlich darin, daß sowohl in die Tiermast, als auch in der Humanmedizin Antibiotika der gleichen Stoffgruppe eingesetzt werden. Die dadurch aufgetretenen Kreuzresistenzen können das Ansprechen dieser Antibiotika in der Humanmedizin verhindern.

Ein Beispiel hierzu ist das seit April 1997 europaweit verbotene Antibiotikum Avoparcin, das weltweit als Wachstumsförderer Verwendung fand. Avoparcin gehört zur Gruppe der Glykopeptid-Antibiotika, zu denen ebenfalls Vancomycin zählt. Dieses in der Humanmedizin eingesetzte Reserveantibiotikum wird unter anderem bei Erkrankungen, die durch den Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) hervorgerufen werden, angewendet

[56]. Die Zulassung von Avoparcin wurde nun widerrufen, da Glykopeptid-resistente Enterokokken aus Nutztieren isoliert werden konnten. Gleichzeitig gab es Probleme bei der Behandlung von Patienten, die Enterokokkeninfektionen aufwiesen [69].

So konnte in den letzten Jahren gegenüber dem Avoparcin verwandtem Vancomycin eine starke Zunahme der Resistenzentwicklung bei Enterokokken beobachtet werden, die auf eine entwickelte Kreuzresistenz zurückzuführen ist [56,57]. Seit dem Verbot von Avoparcin konnte ein kontinuierlicher Rückgang Vancomycin-resistenter Enterokokken in Nutztieren und in der menschlichen Darmflora beobachtet werden [53,73].

Seit Anfang 1999 dürfen weitere Antibiotika europaweit nicht mehr dem Tierfutter beige-mischt werden. Dazu zählt beispielsweise das Streptogramin Virginiamycin. Hierzu gibt es im humanmedizinischen Bereich Wirkstoffäquivalente, wie in Form des Kombinationspräparates Synercid. Genauso verboten wurden die dem Tierfutter beigemischten Makrolide Spiramycin und Tylosin. Ebenso untersagt wurde die Anwendung des Lokalantibiotikums Zink-Bacitracin, dessen Wirkmechanismus dem der Glykopeptid-Antibiotika ähnelt. Für alle vier in der Tierzucht verwendeten Antibiotika wurde die Möglichkeit einer sogenannten Kreuzresistenz bestätigt. Bei den noch restlichen vier zugelassenen Antibiotika, dem Avilamycin, dem Flavophospholipol, dem Salinomycin-Natrium sowie dem Monensin-Natrium konnte eine mögliche Kreuzresistenz noch nicht nachgewiesen werden [69].

Dagegen sind die Antibiotika, gegen die in dieser Arbeit Resistenzen gefunden worden sind, seit Jahren nicht mehr als Leistungsförderer zulässig, oder wurden nie zur Unterstützung in der Tiermast eingesetzt. So ist in Deutschland beispielsweise das Zufüttern von Tetracyclin bei Masttieren seit 1972 verboten. Ähnlich verhält es sich mit Streptomycin, das bis 1970 als Wachstumsförderer bei landwirtschaftlich genutzten Tieren angewendet wurde. Die restlichen Antibiotika, gegen die in dieser Arbeit Resistenzen nachgewiesen worden sind, wurden dagegen nie nachweislich zur Unterstützung in der Tiermast und -zucht verwendet.

Zu beachten ist aber, daß die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika in der Veterinärmedizin zur Behandlung von generalisierten und lokalen Infektionen angewendet werden. Das mit Abstand am häufigsten verwendete Antibiotikum ist Tetracyclin, welches noch 1997 mit 2294 Tonnen in ganz Europa Anwendung fand. Zu therapeutischen Zwecken wurden im selben Jahr 322 Tonnen des Antibiotikum Penicillin angewendet, gefolgt von 154 Tonnen Aminoglykosiden und 75 Tonnen Cotrimoxazol [37]. Anhand dieser Zahlen scheint es nicht verwunderlich, daß der jahrelange therapeutische, aber auch prophylaktische Einsatz

von Antibiotika in den Tierbeständen einen weiteren Grund für die ansteigende Resistenzentwicklung bei Krankheitserregern darstellt. Inwieweit diese Praktiken zur Resistenzsituation koliformer Bakterien beitragen, wurde beispielsweise Anfang der 90er Jahre in der Forschungsstelle Bad Elster, einer Milchviehanlage mit 1930 Kühen, untersucht. Die Anwendung von Antibiotika erfolgte ausschließlich therapeutisch, unter veterinärmedizinischer Kontrolle, wobei zur Behandlung der Rinder Penicillin, Streptomycin und Tetracyclin in verschiedenen Anwendungsformen verabreicht wurde. In der Kälberaufzucht kamen zusätzlich Chloramphenicol, Sulfonamide, Trimethoprim und ein Aminoglykosid zur Anwendung. Wie nachgewiesen wurde, gelangte aus dem Bereich der Kälberaufzucht über 10^9 , zumeist fünf- bis sechsfach resistente coliforme Bakterien, vorrangig *E. coli*, in die Güllesammelbecken und von da aus in die Umwelt. Damit wird deutlich, daß der ausschließlich therapeutische Einsatz von Antibiotika, wie er in diesem Bestand erfolgte, ausreicht, um über die Gülle antibiotikaresistente Bakterien in Größenordnungen freizusetzen, wie sie sonst nur in Klinikabwässern gefunden werden. Zieht man in Betracht, daß die Milchviehanlage dabei bei weitem nicht das bedeutendste Reservoir für antibiotikaresistente Bakterien darstellt, dagegen Kälberaufzuchten sowie Schweine- und Geflügelhaltungen noch weit stärker betroffen sind, wird deutlich, daß der Landwirtschaft bei der Verbreitung von bakteriellen Resistenzen eine bedeutende Rolle zukommt. Das Antibiotikaresistenzgene aus dem tierischen Reservoir auch ohne entsprechenden Selektionsdruck auf Bakterien des Menschen übergehen können, wurde bereits beschrieben [67,68].

Ein weiterer Grund für die steigenden Antibiotikaresistenzen bei Krankheitserreger kann auf den hohen Umgang von Antibiotika in der Humanmedizin zurückgeführt werden, wo Antibiotika nach wie vor eine der wichtigsten Medikamentengruppen darstellen [33]. Studien aus Kanada zeigen beispielsweise, daß 50% aller antibiotischen Verordnungen medizinisch nicht gerechtfertigt sind [70]. Dazu kommen häufig Anwendungsfehler, wie der vorzeitige Abbruch einer wirksamen Therapie oder der fehlende Wechsel zu einer anderen antimikrobiell wirksamen Substanz bei Sekundärinfektionen beziehungsweise die Fortführung der Therapie nach Resistenzentwicklung. Weiter können ein inadäquates Therapieregime, sowie der vorschnelle Einsatz von Antibiotika bei Virusinfektionen die Resistenzentwicklung fördern [70]. Dazu haben sich in den letzten 20 Jahren die betroffene Patientengruppen verändert. Es werden viel mehr alte Menschen behandelt und in Verbindung mit dem medizinischen Fortschritt auch mehr immunsupprimierte Patienten in

der Nephrologie, Hämatologie, Onkologie und Transplantationschirurgie. Die Folge ist ein entsprechender Antibiotikaeinsatz [71].

Ein weiterer Problemkreis bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen könnten die Antibiotikaresistenzgene in gentechnisch veränderten Pflanzen darstellen. Gentechnisch veränderte Pflanzen, wie die Sojabohne, Mais oder Raps, tragen nicht nur das erwünschte Gen, zum Beispiel für die Pestizidresistenz, sondern auch zusätzlich ein Gen für eine Antibiotikaresistenz als Marker. Hier stellt sich die Frage, ob die Resistenzgene beim Einsatz in der Landwirtschaft auf natürliche Bakterien übertragen werden und somit zum Problem der zunehmenden Antibiotikaresistenz beitragen können. Bisherige Labor- und Feldexperimente haben keinen Hinweis auf einen Genaustausch zwischen Pflanzen und Bakterien ergeben. In neueren Arbeiten konnte allerdings nachgewiesen werden, daß durch homologe Rekombination ein solcher Genaustausch möglich ist [55,68]. Die Aufnahme solcher Bakterien durch Rinder und somit die mögliche Übertragung der Antibiotikaresistenzgenen auf Krankheitserreger ist nicht auszuschließen.

Ebenfalls nicht vergessen sollte man die Tatsache, daß im Tierfutter teilweise genmanipuliertes Sojaschrot verwendet wird. Da wiederum Gen-Soja als Marker Antibiotikaresistenzgene enthält, könnte es somit zur direkten Aufnahme von Antibiotikaresistenzgenen bei Masttieren kommen.

Ein anderer Gesichtspunkt betrifft die Behandlung der von STEC verursachten Krankheitsbilder. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die Antibiotikaresistenzen durch antibiotische Chemotherapie erworben wurden, da der Großteil, der durch STEC-Stämme hervorgerufenen Krankheitsbilder, wie die hämorrhagische Colitis oder das lebensbedrohliche HUS, sich bevorzugt bei Kleinkindern bis zum Alter von fünf Jahren manifestiert. Die Anwendung von Tetracyclin, gegen welches sich 17 von 19 Stämmen in dieser Arbeit resistent zeigten, stellt in dieser Altersgruppe eine Kontraindikation dar, da es sich bevorzugt in Calcium-reichen Geweben einlagert. So kann es sowohl das Knochenwachstum hemmen, als auch zu Störungen der Zahnbildung führen. Ähnlich verhält es sich mit Streptomycin, das auf Grund seiner Oto- und Nephrotoxizität keine Anwendung mehr findet und weitgehend durch neuere Aminoglykoside ersetzt wurde [27]. Weiter werden Streptomycin, Tetracyclin und die meisten in dieser Arbeit aufgeführten Antibiotika nicht als klassische Indikation zur Therapie von Durchfallerkrankungen gesehen.

Desweiteren wird bei einer in der Klinik mikrobiologisch nachgewiesenen EHEC-Infektion in den meisten Fällen auf eine Antibiotikatherapie verzichtet, da man auf Grund mehrerer Studien bis heute zu keiner Übereinstimmung über die Vor- bzw. Nachteile einer Antibiotikatherapie gekommen ist [21,38,40,42,43,44,45].

So ist beispielsweise bei der Entwicklung des hämolytisch-urämisches Syndroms nach wie vor keine kausale Therapie oder effektive Prävention bekannt. In mehreren Studien wurde bewiesen, daß verabreichtes Antibiotikum die Freisetzung von Shigatoxin sowohl inhibieren als auch fördern kann [38]. So zeigten sich bei *in vitro* Versuchen, in denen STEC-Stämme subinhibitorischen Konzentrationen verschiedener Antibiotika ausgesetzt waren, bezüglich der Verotoxin Produktion uneinheitliche Ergebnisse. Auf das Antibiotikum Cotrimoxazol beispielsweise reagierten die Stämme mit einer signifikante Steigerung der Toxinfreisetzung [38,49]. Andererseits gibt es wiederum Arbeiten, die von einem starkem Rückgang der Produktion von Stx1 bei *E. coli* O157:H7 Stämmen unter Zugabe von subinhibitorischen Cotrimoxazol Konzentrationen berichten [41]. Ob sich dabei diese Phänomene *in vivo* abspielen ist unklar.

Daneben scheint es stammspezifische Unterschiede bei enterohämorrhagischen *E. coli* zu geben, die subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt wurden. Bei drei unterschiedlichen O157 Stämmen, die entweder Stx₁, Stx₂ oder beide Toxine exprimierten, zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Toxinfreisetzung. Ampicillin führte bei dem Stx₂-produzierendem Stamm zu einer Abnahme der Toxinfreisetzung, zeigte jedoch keinen Effekt auf die beiden anderen Stämme. Waren die Stämme gegenüber beispielsweise Penicillin G, Streptomycin oder Ciprofloxacin ausgesetzt, so konnte man ein Rückgang der Toxinfreisetzung bei zwei Stämmen beobachten, währenddessen die Toxinproduktion des dritten Stammes zunahm. Aus diesen Versuchen läßt sich schließen, daß die Reaktion von O157 Stämmen auf subinhibitorische Konzentrationen verschiedener Antibiotika stark von der Natur des Stammes abhängt und so keine eindeutigen antibiotischen Therapieverhalten vorgeschlagen werden können [39,59].

Auch eine Analyse der klinischen Literatur hinsichtlich eines postulierenden Zusammenhanges zwischen dem Verabreichen von Antibiotika und der Entstehung eines HUS ergibt ein uneinheitliches Bild [20].

So führte bei einer *E. coli* O157-Epidemie in einem Altersheim in Kanada die orale Antibiotikabehandlung zu einer Verschlechterung der Prognose der Patienten. Dabei muss erwähnt werden, daß nur die Erkrankten Antibiotika erhielten, die bereits ein schweres

Krankheitsbild zeigten [42]. Ein ungünstiger Einfluß der antibiotischen Therapie, während der Prodromalphase, wurde auch von Pavia et al. [40] während zweier Ausbrüche von *E. coli* O157 in einem Heim für geistig Behinderte beschrieben. Hier erkrankten insgesamt 23 Personen an überwiegend blutigen Durchfällen. Sechs von acht Patienten, die auf Grund der hämorrhagischen Durchfälle ein Antibiotikum erhalten hatten, entwickelten das Vollbild des hämolytisch-urämischen Syndroms [40], dagegen keiner von 15 Erkrankten ohne diese Komplikation [38]. In einer weiteren Arbeit wurde von einem Kind berichtet, daß bereits vor seiner Infektion mit *E. coli* O157:H7 mit Antibiotika behandelt wurde. Auch hier konnte die von Anfang an durchgeführte antibiotische Therapie nicht die Entwicklung des HUS verhindern [45].

In einer anderen Studie dagegen wurde beobachtet, daß eher die Patienten ein hämolytisch-urämisches Syndrom entwickelten, die nicht antibiotisch behandelt wurden. Allerdings wurde mit der antibiotische Behandlung in diesem Fall relativ spät begonnen [21]. Weiter ist erwähnenswert, daß in einer Studie, in der 117 Kinder ein HUS einwickelten, gerade diejenigen einen besseren Krankheitsverlauf zeigten, die in der Prodromalphase ein Antibiotikum erhalten hatten [43].

Dagegen wiederum sprechen die Beobachtungen von Wong et al. [44], die mittels einer erst kürzlich durchgeführten Studie, das Risiko zur Entwicklung eines hämolytisch-urämischen Syndroms nach Antibiotikatherapie bei Kindern unter zehn Jahren untersuchte. Hier entwickelten eindeutig jene Kinder öfter das hämolytisch-urämische Syndrom, die von Anfang an eine Behandlung mit Antibiotika erhalten hatten. Besonders gefährlich wurden jene Antibiotika bewertet, die eine Sulfa-Komponente enthielten, ebenso wie β -Lactam Antibiotika [44].

Auf Grund der Dynamik der durch STEC hervorgerufenen Infektionen und der aufgeführten *in vitro* Befunde bleibt als Fazit, daß eine antibiotische Behandlung nicht indiziert und empfohlen wird [59]. Unter der Vorstellung, daß dem Shiga Toxin bei der Pathogenese des HUS eine wesentliche Rolle zukommt, kann, gestützt durch *in vitro* Befunde, die Möglichkeit einer Antibiotika induzierten Toxinfreisetzung *in vivo* und damit einer ungünstigen Beeinflussung des Krankheitsverlaufes nicht ausgeschlossen werden [38]. Selbst in Japan, wo die Verabreichung von Antibiotika bei Durchfallerkrankungen, die durch EHEC-Bakterien bedingt sind, häufig ist und wo die Antibiotika Norfloxacin, Fosfomycin und Kanamycin vom Gesundheitsministerium zur Behandlung gegen EHEC empfohlen werden [46,47], beginnt man das Einsetzen von Antibiotika kritischer zu sehen. Nicht zuletzt, dank neuerer

Untersuchungen, die zeigen, daß subinhibitorische Konzentrationen des empfohlenen Fosfomycin unter *in vitro* Bedingungen bei *E. coli* O157:H7 Stämmen zur vermehrten Freisetzung von Stx1 und Stx2 führten [46]. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Yoh et al. [46] überein, die unter anderen, die Wirkung von subinhibitorischen Konzentrationen des Antibiotikum Fosfomycin auf die Shiga Toxin Freisetzung bei enterohämorrhagischen *E. coli* O157 untersuchte [48].

Auf Grund der mäßigen Therapiemöglichkeiten und der eventuellen lebenslangen Folgerkrankungen von HUS und TTP, wie zum Beispiel das chronische Nierenversagen, als auch Bluthochdruck und diverse neurologische Schäden, wird die Prävention von Infektionen durch STEC-Stämme mehr und mehr zur Herausforderung [30]. Regelmäßige Kontrollen von Bauernhöfen und Schlachthöfen sind daher unumgänglich, genauso wie die Aufklärung der Verbraucher über mögliche Infektionsquellen.

Zusammenfassend weisen die Literaturdaten auf die hohe Antibiotikaawendungen in der Landwirtschaft, Veterinär- und Humanmedizin als Ursache für die zunehmende Resistenzentwicklung bei STEC hin. Die in den letzten Jahren zunehmende Resistenzentwicklung der Krankheitserreger gegenüber verschiedene Antibiotika, läßt auf eine Plasmid-vermittelte Übertragung schließen [27]. Diese extrachromosomalen Erbträger haben im Laufe der Evolution die genetische Aufgabe der bakteriellen Flexibilität und Anpassung an veränderte Umweltbedingungen übernommen. Somit konnten Bakterien mit Hilfe der Plasmide in verschiedenen ökologischen Nischen und unter einem extremen Selektionsdruck überleben, wie er heute mit dem Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft und in der Medizin vorkommt [33]. Mittels der Plasmide können Bakterien relativ rasch durch horizontalen Gentransfer Antibiotikaresistenzgene untereinander austauschen. So sind Plasmide in der Lage Resistenzfaktoren mittels Konjugation von einem plasmidhaltigen auf ein plasmidfreies Bakterium zu übertragen. Genauso ist es ihnen möglich, Resistenzfaktoren auf ein Bakterium mit einem bereits vorhandenen Resistenzplasmid zu übertragen, wobei Mehrfachresistenzen entstehen können. In dieser Arbeit konnten bei 15 von 19 STEC-Stämmen Mehrfachresistenzen nachgewiesen werden, die auf eine Koselektion solcher multiresistenter Plasmide zurückgeführt werden kann. Eine andere Art des horizontalen DNA-Transfers ist mit Hilfe von transduzierenden Phagen möglich, der neben seinem eigenem Genom noch Teile des Wirtsgenoms mit in eine neue Wirtszelle einbringen kann. Auch so kann es zur Übertragung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen kommen.

In dieser Arbeit konnten bei vier der neunzehn Resistenzen aufweisenden STEC-Stämme Resistenzübertragungen auf den Antibiotika sensiblen *E. coli* DH5 α -Stamm mittels Konjugation nachgewiesen werden.

Neben Tetracyclin, welches als primärer Marker verwendet wurde, wurden bei zwei der vier konjugierbaren Stämme ebenfalls Ampicillin und Piperacillin übertragen. Nie kam es dagegen zur Übertragung der Antibiotika Chloramphenicol oder Streptomycin. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß mit Verwendung des entsprechenden Antibiotika als Marker es ebenfalls zur Übertragung dieser, möglicherweise auf anderen Plasmiden lokalisierter, Resistenzgene kommen könnte.

Die zunehmenden Antibiotikaresistenzen bei STEC haben sowohl klinische als auch epidemiologische Bedeutung. Resistente STEC-Stämme haben in Viehbeständen, in denen Antibiotika zur Mästung oder zu therapeutischen Zwecken eingesetzt wird, einen selektiven Vorteil gegenüber anderen koliformen Bakterien. Daraus kann eine bessere Durchsetzungsfähigkeit resistenter STEC-Stämme bei Rindern resultieren, wie auch die Gefahr einer potentielle Übertragung resistenter Pathogene auf den Menschen.

Auf der anderen Seite könnte die ansteigende Anzahl Antibiotika-resistenter Stämme in Zukunft zu einer rasch durchführbaren epidemiologische Nachweismethode führen. So könnte man beispielsweise mittels eines Antibioogrammes sporadisch auftretende Krankheitsfälle von solchen unterscheiden, die einer gemeinsamen Infektionsquelle entstammen. Auf Grund der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse sollten hierzu Tetracyclin, Ampicillin, Piperacillin, Cotrimoxazol, Chloramphenicol und Streptomycin in die zu untersuchenden Antibiotika aufgenommen werden.

Um in der Zukunft eine Minimierung von Antibiotikaresistenzen tierischer Herkunft zu erreichen, sollte eine Reihe von Maßnahmen überdacht werden. So sollte die nationale und internationale Überwachung der Resistenzentwicklung bei STEC-Stämme ein wichtiges diagnostisches Kriterium darstellen, um Krankheitsverläufe in Zukunft besser kontrollieren zu können. Weiter sollte man bemüht sein, die Zufütterung von Antibiotika in der Tierzucht zu verringern und auf lange Sicht ganz abzuschaffen. Vorbild hierzu ist Schweden, wo Antibiotika seit 1986 als Zusatzmittel bei der Tierzucht verboten ist. Hier konnte durch verbesserte Hygienemaßnahmen in der Tierhaltung der anfängliche Produktionsrückgang

ausgeglichen werden [35]. Auch die Schweiz verzichtet als zweites europäisches Land seit Anfang 1999 auf antimikrobielle Leistungsförderer in der Nutztierhaltung [54].

Auf lange Sicht würde sich Investitionen in die Optimierung der Haltungs- und Hygienebedingungen in der Tiermast auszahlen. Durch den so qualitativ und quantitativ verminderten Einsatz von Antibiotika würde der Selektionsdruck der Bakterien nachlassen und somit die Entstehung und Verbreitung resistenter Varianten vermindert werden.

5. Zusammenfassung

Einhundertvierundvierzig STEC-Stämme von Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom (68 Stämme), von Durchfallpatienten (42 Stämme) und von asymptomatischen Ausscheidern (44 Stämme) wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit hin untersucht. Zu den insgesamt 13 getesteten Antibiotika zählten die β -Laktam Antibiotika Ampicillin, Piperacillin, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefotiam und Imipenem, die Aminoglykoside Gentamicin und Streptomycin, die Gyrasehemmer Ofloxacin und Ciprofloxacin sowie Tetracyclin, Chloramphenicol und die Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol.

Alle *E. coli* O157 Stämme, die von Patienten mit HUS isoliert wurden, waren sensibel gegen die getesteten Antibiotika. Lediglich ein *E. coli* O157 Stamm, der von einem Durchfall-Patienten isoliert wurde, zeigte eine Resistenz gegen Tetracyclin. Allgemein häufiger wurden Antibiotikaresistenzen bei non-O157 Stämmen gefunden. Fünf von 22 non-O157 Stämmen, die von HUS-Patienten isolierten wurden, zeigten mindestens eine Resistenz gegen die getesteten Antibiotika. Vierzehn von fünfunddreißig non-O157 *E. coli* Stämmen, die sowohl von Durchfall-Patienten als auch von asymptomatischen Ausscheidern stammten, konnten sowohl Einfachresistenzen als auch Multiresistenzen aufweisen.

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) zeigte, daß alle resistente Stämme einen extrem hohen Resistenzstatus besitzen.

Sowohl β -Laktam als auch Tetracyclin Resistenzen konnten mittels Konjugation auf einen *E. coli*-Laborstamm übertragen werden. Dies läßt die Anwesenheit von R-Plasmiden vermuten.

Die Tatsache, daß über 12% Shigatoxin produzierender *E. coli* Stämme aus humanen Stuhlproben Antibiotikaresistenzen aufweisen, hat klinische und epidemiologische Bedeutung. Resistente STEC-Stämme hätten einen selektiven Vorteil gegenüber anderen koliformen Bakterien in Mastbetrieben, die Antibiotika dem Futtermittel beimengen. Hieraus wiederum steigt die Gefahr einer potentiellen Übertragung resistenter Pathogene auf den Menschen. Auf der anderen Seite könnte die ansteigende Anzahl Antibiotika-resistenter Stämme zu einer rasch durchführbaren epidemiologischen Nachweismethode führen.

6. Literaturverzeichnis

1. **Stewart P.J., Desormeaux W., Chene J., Lior H.** Hemorrhagic colitis in a home in Ontario. CMAJ. 1986. **134**:50.
2. **Cody S.H., Glynn M.K., Farrar J.A., Cairns K.I., Griffin P.M., Kobayashi J., Fyfe M., Hoffman R., King A.S., Lewis J.H., Swaminathan B., Bryant R.G., Vugia D.J.** An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. Ann. Intern. Med. 1999. **130**:209-209.
3. **Griffin P. and Tauxe R.V.** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev. 1991. **13**:60-98.
4. **Beutin L.** Die Bedeutung und Erkennung von *Escherichia coli* als Krankheitserreger beim Menschen. Bundesgesundheitsbl. 1990. **33**:380-386.
5. **Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L.** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 1983. **308**:681-685.
6. **Karch H. and Bockemühl J.** Infections by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): a clinical and microbiologic problem and a challenge for the public health service. Immun. Infekt. 1989. **17**:206-211.
7. **Levine M.M., Xu J.G., Kaper J.B., Lior H., Prado V., Tall B., Nataro J., Karch H., Wachsmuth K.** A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. J. Infect. Dis. 1987. **156**:175-182.

8. **Bockemühl J., Karch H., Tschäpe H.** Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundheitsbl. 1997. **40**:194-196.
9. **Beutin L., Niemer U.** Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)-Erfordernisse und Möglichkeiten für das öffentliche Gesundheitswesen. Bundesgesundheitsbl. 1995. **38**:422-427.
10. **Karmali M.A.** Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1989. **2**:15-38.
11. **Huppertz H.I., Busch D., Schmidt H., Aleksic S., Karch H.** Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. J. Pediatr. 1996. **128**:341-346.
12. **Schmidt H., Beutin L., Karch H.** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 1995. **63**:1055-1061.
13. **Tarr P.J.** *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. Clin. Infect. Dis. 1995. **20**:1-8.
14. **Reida P., Wolff M., Pöhls H.W., Kuhlmann W., Lehmacher A., Aleksic S., Karch H., Bockemühl J.** An outbreak due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care center characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. Zentralbl. Bakteriол. 1994. **281**:534-543.
15. **Renwick S.A., Wilson J.B., Clarke R.C., Lior H., Borczyk A., Spika J., Rahn K., McFadden K., Brouwer A., Copps A.** Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. J. Infect. Dis. 1993. **168**:792-793.
16. **Bockemühl J., Karch H., Rüssmann H., Aleksic S., Wiß R., Emmerich P.** Shiga-like toxin (verotoxin) produzierende *Escherichia coli* O22:H8. Bundesgesundheitsbl. 1990. **33**:3-6.

17. **Kist M., Beutin L., Bockemühl J., Karch H., Hesseman J.** Empfehlung der Fachgruppe "Gastrointestinale Infektionen" der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) zur mikrobiologischen Diagnostik der Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). *Der Mikrobiologe* 1995. **5**:124-125.
18. **Beutin L., Zimmermann S., Gleier D.** Zur Epidemiologie und Diagnostik von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland. *Bundesgesundheitsbl.* 1996. **39**:326-331.
19. **Tarr P.I., Neill M.A., Christie D.L., Anderson D.E.** *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis. *N. Engl. J. Med.* 1998. **318**:1697.
20. **Griffin P.M.** *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: (Blaser, M.J., Smith, P.K., Ravdin, J.I., Greenberg, H.B. und Guerrant, R.L., Eds.). *Infections of the Gastrointestinal Tract.* 1995. Raven Press, pp. 739-762, New York.
21. **Proulx F., Turgeon J.P., Delage G., Lafleur L., Chicoine L.** Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J. Pediatr.* 1992. **121**:299-303.
22. **Du Pont H.L., Hornick R.B.** Adverse effect of lomotil therapy in shigellosis. *JAMA* 1973. **226**:1525-1528.
23. **Cimolai N., Carter J.E., Morrison B.J., Anderson J.D.** Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. *J. Pediatr.* 1990. **116**:589-592.
24. **Cimolai N., Morrison B.J., Carter J.E.** Risk factors for the central nervous system manifestations of gastroenteritis-associated hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics.* 1992. **90**:616-621.
25. **Farina C., Goglio A., Conedera G., Minelli F., Caprioli A.** Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996. **15**:351-353.

26. **Ratnam S., March S.B., Ahmed R., Bezanson G.S., Kasatiya S.** Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. J. Clin. Microbiol. 1998. **26**:2006-2012.
27. **Kim H.H., Samadpour M., Grimm L., Clausen C.R., Besser T.E., Baylor M., Kobayashi J.M., Neill A., Schoenknecht F.D., Tarr P.I.** Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984-1991. J. Infect. Dis. 1994. **170**:1606-1609.
28. **Willshaw G.A., Cheasty J.A., Frost J.A., Threlfall E.J., Rowe B.** Antimicrobial resistance of O157 VTEC in England and Wales. Notizario dell'Istituto di Sanita. 1996. **9**:3-4.
29. **Prado V., Basualdo W., Arellano C., Martinez J., Levine M.M.** In vitro susceptibility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to 11 antimicrobials. Relationship between antibiotic resistance and toxigenic genotype. Rev. Med. Chil. 1995. **123**:1085-1090.
30. **Paton J.C., Paton A.W.** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 1998. **11**:450-479.
31. **Althaus F.** Antimikrobielle Chemotherapeutika-Entzündungshemmer. Text Kapitel V.O. ABC als Leistungsförderer. 1999. URL:<http://www.vetpharmunizh.ch/script/antchem/antcVIO.html>.
32. **Johnson R.P., Clarke R.C., Wilson J.B., Read S.C., Rahn K., Renwick S.A., Sandhu K.A., Alves D., Karmali M.A., Lior H., Mcewen S.A., Spika J.S., Gyles C.L.** Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. J. Food. Protect. 1996. **59**:1112-1112.
33. **Tschäpe H.** Die Resistenzentwicklung gegen Antibiotika-Biologische Grundlagen und klinische Relevanz. Dtsch. Zahnärztl. Z. 1997. **52**:713-717.

34. **Haarmann C., Karch H., Frosch M., Schmidt H.** A 3,3-kb plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is closely related to the core region of *Salmonella typhimurium* antibiotic resistance plasmid NTP16. *Plasmid*. 1998. **39**:134-140.
35. **Witte W.** Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*. 1998. **279**:996-997.
36. **Speer B.S., Shoemaker N.B., Salyers A.** Bacterial resistance to tetracycline mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992. **5**:387-399.
37. **FEDESA.** Antibiotics for Animals. A FEDESA perspective on antibiotics, animal health and the resistance debate. Antibiotic use - the facts. Veterinary consumption of therapeutic antibiotics in Europe. 1999. URL:http://www.fedesa.be/eng/PublicSite/xtra/dossiers/doss9/Page_07.html.
38. **Bitzan M., Müller-Wiefel D.E., Schwarzkopf A., Karch H.** Die Rolle von Antibiotika beim Management des Verotoxin-assoziierten hämolytisch-urämischen Syndroms. *Immun. Infekt.* 1992. **20**:168-172.
39. **Grif K., Dierich M.P., Karch H., Allerberger F.** Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1998. **17**:761-766.
40. **Pavia A.T., Nichols C.R., Green D.P., Tauxe R.V., Mottice S., Greene K.D., Wells J.G., Siegler R.L., Brewer E.D., Hannon D.** Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiological observations. *J. Pediatr.* 1990. **116**:544-551.
41. **Walterspiel J.N., Ashkenazi S., Morrow A.L., Cleary T.G.** Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection*. 1992. **20**:25-29.

42. **Carter A.O., Borczyk A.A., Carlson J.A., Harvey B., Hockin J.C., Karmali M.A., Krishnan C., Korn D.A., Lior H.** A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.* 1987. **317**:1496-500.
43. **Belongia E.A., Osterholm M.T., Soler J.T., Ammend D.A., Braun J.E., Mac Donald K.L.** Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *JAMA.* 1993. **269**:833-888.
44. **Wong C.S., Jelacic S., Habeeb R.L., Watkins S.L., Tarr P.I.** The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* 2000. **342**:1930-1936.
45. **Igarashi T., Inatomi J., Wake A., Takamizawa M., Karayama H., Iwata T.** Failure of pre-diarrheal antibiotics to prevent hemolytic uremic syndrome in serologically proven *Escherichia coli* O157:H7 gastrointestinal infection. *J. Pediatr.* 1999. **135**:768-769.
46. **Yoh M., Frimpong E.K., Voravuthikunachi S.P., Honda T.** Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Can. J. Microbiol.* 1999. **45**:732-739.
47. **Tsuboi L., Ida H., Yoshikawa E., Hiyoshi S., Yamaji E., Nakayama I., Nonomiya T., Shigenobu F., Shimizu M., O'Hara K., Sawai T., Mizuoka K.** Antibiotic susceptibility of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolated from an outbreak in Japan in 1996. *Antimicrob. Agents. Chemothera.* 1998. **42**:431-432.
48. **Yoh M., Frimpong E.D., Honda T.** Effect of antimicrobial agents, especially fosfomycin, on the production and release of Vero toxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1997. **19**:57-64.
49. **Acheson D., Keusch G.** Which Shiga toxin-producing types of *E. coli* are important? *ASM-News.* 1996. **62**:302-306.

50. **Law D.** Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. J. Appl. Microbiol. 2000. **88**:729-745.
51. **Buhter T., Islam M.R., Azad M., Jones P.K.** Risk factor for development of hemolytic uremic syndrome during shigellosis. J. Pediatr. 1987. **110**:894-897.
52. **Hofinger C., Karch H., Schmidt H.** Structure and function of plasmid pCo1D157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and its distribution among strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. 1998. **36**:24-29.
53. **Kovacs M.** Antibiotika in Lebensmitteln: Resistenzentwicklungen. 1998. URL:http://www.wdr.de/tv/service//kostprobe/kp_sarchiv/1998/03/09_1.html.
54. **Haas E.** Beobachter-Thema AML. 1/1999. Tiermast: Schluss mit Antibiotika. 1999. URL: <http://www.beobachter.ch/magazin/archiv/artikel.cfm>.
55. **de Vries J., Wachernagel W.** Detection of nptII (kanamycin genes) in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. Mol. Gen. Genet. 1998. **257**:606-613.
56. **BGVV: Pressedienst.** Einsatz des Futterzusatzstoffes Avoparcin wird europaweit verboten. 1996. URL:http://www.bgvv.de/presse/1996/pr_96_24.htm.
57. **Bates J.** Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. J. Hosp. Infect. 1997. **37**:89-101.
58. **Huppertz H.I., Rutkowski S., Aleksic S., Karch H.** Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. Lancet. 1997. **349**:1660-1662.
59. **Guerrant R., Van Gilder R., Steiner T., Thielman N., Slutsker L., Tauxe V., Hennessy T., Griffen P., Dupont H., Sack B., Tarr P., Neill M., Nachamdin I., Reller L., Osterholm M., Bennisch M., Pickering L.** Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. Clin. Infect. Dis. 2001. **21**:321-350.

60. **Levine M.M.** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enterinvasive, enterohemorrhagic, and enteradherent. *J. Infect. Dis.* 1987. **155**:377-389.
61. **Chan K.N., Phillips A.D., Knutton S., Smith H.R., Walker-Smith J.A.** Enteroaggregative *Escherichia coli*: another cause of acute and chronic diarrhoea in England? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1994. **18**:87-91.
62. **Hart C.A., Batt R.M., Saunders J.R.** Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. *Ann. Trop. Paediatr.* 1993. **13**:121-31.
63. **Bruner W., Schmidt H., Karch H.** EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* 1997. **24**:767-778.
64. **Law D., Chart H.** Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 1998. **84**:685-697.
65. **Karch H. and Köhler B.** Neue Erkenntnisse zur Molekularbiologie der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157. *Gesundheitswesen* 1999. **61**:46-51.
66. **Bruner W., Schmidt H., Karch H.** KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology.* 1996. **142**:3305-3315.
67. **Böttcher I., Stelzer W., Lenk T.** Antibiotikaresistente koliforme Bakterien in Abwasser und Gülle einer Milchviehanlage. *Bundesgesundheitsbl.* 1992. **35**:62-69.
68. **Feuerpfeil I., Lopez-Pila J., Schmidt R., Schneider E., Szewzyk R.** Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsbl.* 1999. **42**:37-50.
69. **Helmuth R.** Einsatz antimikrobiell wirksamer Substanzen in der Veterinärmedizin. *Bundesgesundheitsbl.* 1999. **42**:26-34.

70. **Wallmann J.** Antibakterielle Chemotherapie unter dem Aspekt der Antibiotikaresistenz. Bundesgesundheitsbl. 1999. **42**:58-61.
71. **Witte W., Klare I.** Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern. Bundesgesundheitsbl. 1999. **42**:8-16.
72. **Trollenier H.** Antibiotika in der Tierhaltung. Bericht über ein Expertentreffen unter der Leitung der WHO vom 13. bis 17. Oktober 1997 im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Berlin. Bundesgesundheitsbl. 1997. **41**: 257-259.
73. **Teuber M.** Antibiotikaresistenzen-Ausbreitung und Konsequenzen. 2000. URL:<http://www.vdbiol.de/artikel/teuber.html>.3.

Lebenslauf

16.06.1973 geboren in Prien am Chiemsee

1980-1984 Volksschule in Augsburg

1984-1991 Gymnasium in Augsburg

1991-1993 Aufenthalt in Frankreich, mit Abschluß des franz. Baccalaureat

1993-2000 Studium der Humanmedizin in Budapest, Würzburg und München

Juni 1995 Physikum, Budapest

September 1996 1. Staatsexamen, Würzburg

März 1999 2. Staatsexamen, Würzburg

Juni 2000 3. Staatsexamen, München

Dezember 2000 AIP in der Abteilung Innere Medizin im Krankenhaus Barmherzige Brüder, München.

Dr. Michaela Deeg

Herrn Prof. Dr. Frosch danke ich für die an seinem Institut gewährten Arbeitsmöglichkeiten.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Karch bedanke ich mich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Schmidt für die Überlassung des Themas, sein persönliches Engagement sowie der stets freundlichen und kritischen Betreuung der experimentellen Arbeiten.

Bei Frau Prof. Dr. Moll möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Carsten Speckmann möchte ich für sein reges Interesse und seine große Unterstützung danken.