

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel  
Veterinärwissenschaftliches Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau PD Dr. B. Schalch

erstellt am  
Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,  
Dienststelle Oberschleißheim  
Dr. U. Busch

**Vorkommen und Charakterisierung von enteropathogenen  
*Escherichia coli* Isolaten aus Lebensmitteln, Wasser und humanen  
Ursprungs**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Marta García Díez  
aus León (Spanien)

München 2009

















Darüber hinaus gibt es noch weitere *E. coli*-Pathovaren. So ermittelten zum Beispiel Arbeitsgruppen aus Frankreich die mögliche Beteiligung einer anderen durchfallauslösenden *E. coli*-Gruppe: Adherent invasiven *E. coli* (AIEC) an der Morbus Croni, die durch chronischen Durchfall bei Menschen gekennzeichnet ist (Darfeuille-Michaud et al. 2004).

## 2.3 Enteropathogene *E. coli*

Im Jahr 1945 wies der Pädiater John Bray in Großbritannien die erste pathogene *E. coli*-Variante bei an Durchfall erkrankten Kindern nach. Die Keime wurden als „enteropathogene *Escherichia coli*“ bezeichnet, um sie von den apathogenen *E. coli* zu unterscheiden (Bray 1945). Die Bakterien gelten weltweit als Auslöser der sogenannten Säuglingsdiarrhoe, da vor allem Säuglinge und Kleinkinder erkranken (Nataro und Kaper 1998).

Heute werden EPEC-Stämme folgendermaßen definiert: Sie können charakteristische „attaching and effacing“ (AE) Läsionen in der Darmschleimhaut hervorrufen und bilden, im Gegensatz zu EHEC/STEC, kein Shigatoxin 1 bzw. 2 (Kaper 1996).

### 2.3.1 Taxonomie

Die Serotypisierung stellt heutzutage aufgrund des großen Polymorphismus der O- (Lipopolysaccharide der Zelloberfläche) und H- (Geißelprotein) Antigene bei der ersten Subdifferenzierung von *E. coli* Bakterien die Methode der Wahl dar.

Die Zellwand von *E. coli* besteht aus einer komplexen äußeren Membran, deren wichtigste Bestandteile die Lipopolysaccharid-Moleküle (LPS) darstellen. LPS-Moleküle besitzen eine spezifische Polysaccharidseitenkette, die immunologisch als **O-Antigene** wirken. Bisher sind 181 verschiedene O-Antigene bekannt (Fruth 2005). Bei **H-Antigenen** handelt es sich um Geißelantigene. Hier wurde von 56 verschiedenen Arten berichtet. Die Flagellen bestehen aus dem vom *fliC*- Gen kodierten Protein Flagellin, welches die H-Antigenizität vermittelt (Prager et al. 2003). Die Typisierungsmethoden von *E. coli*-Isolaten wurden vom „Kauffmann-White-Schema“ für Salmonellen

übernommen, welche eine Unterscheidung in verschiedene Serovaren/Serotypen anhand einer O:H Formel erlaubt (Ørskov und Ørskov 1984; Prager et al. 2003; Scheutz und Strockbine 2005; Fruth 2005).

In der Literatur werden die folgenden traditionellen oder klassischen humanen EPEC-Serogruppen O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 und O158 beschrieben (WHO 1987).

Jedoch zeigen bestimmte *E. coli*-Serotypen eine hohe Plastizität und Variabilität. Diese Tatsache spiegelt sich in den unterschiedlichen akquirierten Virulenzfaktoren wieder, was zu den verschiedenen *E. coli*-Pathovaren führt. So kann Serovar O26:H11 zu unterschiedlichen *E. coli* Pathovaren, z. B. zu EPEC oder zu EHEC, gehören (Bielaszewska et al. 2005).

Olensen et al. (2005) beschrieben darmpathogene *E. coli* bei an Durchfall erkrankten Kindern. Sie stellten bezüglich EPEC fest, dass manche Serotypen auch bei asymptomatischen Fällen bestätigt werden konnten. Dementsprechend wurde für den EPEC-Nachweis eine Untersuchungskombination der EPEC klassischen WHO-Serotypen und Virulenzfaktoren vorgeschlagen.

Heutzutage steht die Untersuchung der Virulenzfaktoren im Vordergrund, um die Isolate sicher einem *E. coli*-Pathovaren zu ordnen zu können (Campos et al. 2004; Jensen et al. 2007; Yang et al. 2007; Busch 2008).

### **2.3.2 Typische und atypische EPEC**

Im Jahr 1996 fand in São Paulo das „zweite internationale Symposium zu EPEC“ statt. Zu diesem Zeitpunkt wurden EPEC-Stämme anhand der Anwesenheit des EAF-Plasmids definiert: Stämme, die das EAF-Plasmid enthalten, wurden als „typische“, Stämme ohne Plasmid als „atypische“ EPEC bezeichnet (Kaper 1996).

Die typischen Stämme (tEPEC) zeigten eine örtlich begrenzte Anheftung von Mikrokolonien bei der Infektion der Zellkulturen. Diese „localized adherence“ (LA) wird durch den Bundle-Forming-Pilus (*bfpA*-Gen) vermittelt. Seine Beteiligung bei enteralen Erkrankungen wird als gesichert betrachtet. Atypische Stämme (aEPEC) sind dagegen nicht in der Lage solche Fimbrien zu exprimieren, da sie kein Plasmid enthalten. Ihr Adhärenzmuster wurde von











































































































































































Smith et al. 2004; Saito et al. 2005; Wu et al. 2008). Gründe für diese Widersprüche sahen Ochoa et al. (2008) in einer nicht übereinstimmenden Definition der Untersuchungskriterien, wie zum Beispiel Alter der Zielgruppe oder eingesetzte Methoden. Da in der vorliegenden Arbeit nicht in jedem Fall Information über die klinischen Daten der Patienten vorlagen, kann eine krankheitsauslösende Rolle der EPEC-Bakterien lediglich als Hypothese dienen.

### **Ermittelte Serovare**

Die O:H-Serotypisierung stellt die klassische Methode für die EPEC Identifizierung dar. Im Jahr 1987 schlug die World Health Organisation (WHO) 12 O-Serogruppen zur EPEC-Charakterisierung vor. So haben sich manche Arbeiten auf die Untersuchung dieser 12 O-Antigene begrenzt. Grund dafür ist die noch unbekannt pathogene Bedeutung der nicht-WHO EPEC-Serogruppen, da sie zum Teil auch bei gesunden Patienten isoliert wurden (Ansaruzzaman et al. 2000; Olensen et al. 2005). Jedoch zeigten verschiedenen Studien einerseits, dass *E. coli* nicht anhand der Serogruppe in eine Pathogruppe eingeteilt werden kann (Campos et al. 2004; Ellias et al. 2002) und andererseits, dass der Nachweis von EPEC nicht über die Serogruppe, sondern ausschließlich über die Bestätigung des Vorhandenseins des *eae*-Gens und Abwesenheit der *stx*-Gene geführt werden sollte (Kozub-Witkowski et al. 2007; Yang et al. 2007).

Die Serotypisierungsergebnisse, die in dieser Arbeit vorgelegt wurden, zeigten die Anwesenheit von WHO-klassischen EPEC-O-Serogruppen nur in 26 Fällen, was 19 % der gesamten Stämme entsprach. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten von anderen Autoren und beweisen die starke Prävalenz der nicht klassischen WHO-O:H-Kombinationen, die im Rahmen von epidemiologischen Studien berücksichtigt werden muss (Gonzalez et al. 2000; Okeke et al. 2000; Vieira et al. 2001; Robins-Browne et a. 2004; Prère et al. 2006). Dadurch wurden bei den vorliegenden Untersuchungen, nach der Definition von Kaper (1996), alle *eae*-positiven und *stx*-negativen Stämme als EPEC angesehen.

Die Isolate menschlichen Ursprungs gehörten am häufigsten den Serovaren O139:H14/H- (n=7) und O113:H6, O128:H2, O156:H8 (jeweils n=5) an. Das Serovar **O139:H14** wurde ebenfalls von Blanco et al. (2004b) bei Affen in Brasilien bestätigt. Robins-Browne et al. (2004) fanden dieses Serovar bei erkrankten und gesunden Patienten in Australien.

Bei Lebensmittel und Wasser waren die ermittelten Serovare vielfältig. Das Serovar O156:H8 (n=4) zeigte bei den Lebensmittelisolaten ein gehäuftes Auftreten. Bei den Wasserstämmen wurden sechs unterschiedliche Serovare bestätigt.

Die Serovare, die bei Lebensmitteln, Wasser und Mensch übereinstimmten, waren **O23:H8; O26:H11/H-, O33:H6, O103:H2, O127:H40, O128:H2 und O156:H8**, was 46,2 % der nachgewiesenen Lebensmittel- und Wasserstämme und 18,6 % der humanen EPEC darstellte. Bei dem Serovar O23:H8 handelte es sich um den einzigen tEPEC innerhalb der Lebensmittel- und Wasserstämme. EPEC-O26:H11/H- trat bei zwei Personen und zwei Milchisolaten auf. Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben von Da Silva et al. (2001), die sich mit der Untersuchung pasteurisierter Milch in Brasilien beschäftigten. Auch Najand und Ghanbarpour (2006) berichteten von mit O26-EPEC-Isolate kontaminiertem Käse. EPEC-O127:H40 kam in dieser Arbeit bei vier Stuhl- und einem Wasserisolat vor. Robins-Browne und Hartland (2002) bezeichneten dieses Serovar als eines der häufigsten bei humanen Infektionen. Sieben Stämme wurden als O128:H2 charakterisiert. Das Serovar trat sowohl bei vier Isolaten aus Stuhlproben als auch bei zwei Milchisolaten auf. Da Silva et al. (2001) könnten diese Serovare ebenfalls in Milchproben bestätigen. Auch Gonzalez et al. (2000) und Najand und Ghanbarpour (2006) fanden EPEC der O127- und O128-Serogruppen bei Weichkäse. Das Serovar O156:H8 wurde bei acht Stämmen ermittelt; vier aus Milch und vier humanen Ursprungs. Mora et al. (2007) brachten *stx2*-positive STEC-O156:H8-Stämme in Zusammenhang mit Hackfleisch, es konnte aber kein Pendant in der Literatur über den Nachweis dieses Serovars bei Lebensmitteln ohne Toxinproduktion gefunden werden.

## **Charakteristika der EPEC-Isolate und epidemiologische Betrachtung**

Das *eae*-Gen kodiert für das Protein „Intimin“, dessen wichtigstes phänotypisches Merkmal die Auslösung der sogenannten „attaching and effacing“-Läsionen darstellt. Seitdem die Vielfalt des 3'-Bereiches des *eae*-Gens aufgedeckt wurde, fokussieren sich mehrere EPEC-Projekte auf die Untersuchung der verschiedenen **Intiminvarianten** (Frankel et al. 1994; Adu-Bobie et al. 1998a, 1998b).

Einerseits wurden in der vorliegenden Arbeit die Proben mittels Real-Time-PCR zum Nachweis des konservativen Bereiches des Intimin-Gens untersucht, um alle EPEC-Bakterien schnell und zuverlässig in den Mischkulturen nachzuweisen. Andererseits wurde das *eae*-Gen auf seine verschiedenen Varianten mittels konventioneller PCR weiter analysiert.

Zwei verschiedene Primersysteme kamen zum Einsatz, so dass schließlich 98 % der EPEC-Stämme mit einer Intiminvariante in Verbindung gebracht werden konnten. Das Primersystem der Arbeitsgruppe von Blanco et al. (2006a, 2006b) erwies sich als sensitiver als das von Oswald et al. (2000) und Zhang et al. (2002), da das Intimin von mehr Isolaten charakterisiert werden konnte. Jedoch kann der Einsatz dieser Intimin-Feincharakterisierung in der Routineuntersuchung aus finanziellen und zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden, so dass sie hauptsächlich für wissenschaftliche Fragestellungen herangezogen wird.

Die in dieser Studie am häufigsten detektierten Intiminvarianten bei humanen EPEC waren das  $\beta$ -Intimin (31,7 % der EPEC-Stämme), gefolgt von  $\theta/\gamma$ 2-Intimin (21,6 %) und  $\alpha$ -Intimin (11,5 %). Dieses Resultat stimmt mit Literaturangaben überein. Die  $\beta$ -Intiminvariante steht weltweit als häufige Variante im Zusammenhang mit EPEC nicht nur bei Menschen (Beutin et al. 2003; Nunes et al. 2003; Blanco et al. 2006a, 2006b; Kozub-Witkowski et al. 2007) sondern auch bei Tieren (Penteado et al. 2002; Krause et al. 2005; Blanco et al. 2005; Aidar-Ugrinovich et al. 2007; Malik et al. 2006).

Die vorliegenden Untersuchungen bei EHEC ergaben den Nachweis von Intimin  $\epsilon$  (n=8),  $\theta/\gamma$ 2 (n=5) und  $\beta$ ,  $\gamma$ 1 (jeweils n=4) als häufigste Varianten. Diese

Ergebnisse decken sich mit Daten aus der Literatur. Bei STEC-Isolaten aus Stuhl und Kot überwogen die Varianten  $\gamma$ 1,  $\beta$  und  $\epsilon$  (Beutin et al. 2004; Blanco et al. 2004; Jensen et al. 2007).

Mehrere Autoren betrachten die Intimin-Bestimmung als ein wichtiges Werkzeug für die EPEC- und EHEC-Charakterisierung in der Routinediagnostik und bei **epidemiologischen** Studien (Zhang et al. 2002; Blanco et al. 2006b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente die Intimin-Subtypisierung zum einem als grundlegendes Merkmal für die weitere Charakterisierung von 25 nicht typisierbaren O-Serogruppen (Ont), was die Differenzierung eines möglichen neuen O-Antigenes bei den Serovaren Ont:H6 (Intimin  $\alpha$ 2) zu Folge hatte (Fruth 2007). Des Weiteren kann die Identifizierung von Intimin die genetische Variabilität innerhalb eines bestimmten Serovars verdeutlichen. So wurden zum Beispiel bei zwei Stämmen des EPEC-Serovars O103:H2 unterschiedliche Intiminvarianten bestätigt (Intimin- $\beta$ 1 und  $-\epsilon$ ), was auf Stämme verschiedenen Ursprungs und klonaler Gruppen hinwies. EPEC und EHEC-O103-Stämme wurden aufgrund ihrer großen Verbreitung und Virulenz ausführlich untersucht. So wiesen EPEC-O103-Stämme in der Regel das Intimin  $\beta$  auf, während bei EHEC-O103 die Variante  $\epsilon$  vorkam (Prager et al. 2002; Beutin et al. 2005a).

Die Intimincharakterisierung und die Serotypisierung galten als Kriterium, um bestimmte EPEC-Isolate für eine epidemiologische Einschätzung auszuwählen. Dann wurde die PFGE eingesetzt, um mögliche Ähnlichkeiten zwischen Isolaten aus Lebensmitteln und Wasser und Isolaten aus Stuhlproben aufzudecken. 36 EPEC-Isolate mit übereinstimmender Serovare und Intiminvariante wurden so analysiert. Außerdem wurden zwei Isolate des Serovars O103:H2 mit divergierendem Intimin und drei Ont:H21 ausgewählt, um mögliche Verbindungen zwischen diesen Isolaten aufzudecken. Die Ergebnisse dieser Prüfung ergaben insgesamt fünf verschiedene „Cluster“ ( $\geq 85$  % Ähnlichkeit), die Isolate sowohl aus Lebensmitteln als auch von Menschen enthielten, wobei zwei davon demselben Serovar (O156:H8) angehörten. Folglich konnten in diese fünf klonalen Gruppen oder Cluster folgende Isolate eingeordnet werden:

- Cluster I O156:H8, Intimin  $\theta/\gamma 2$  (89,6 % Ähnlichkeit); 2 x Milch-, ein Humanisolat
- Cluster II O156:H8, Intimin  $\theta/\gamma 2$  (85 %); ein Milch- und ein Humanisolat.
- Cluster III O128:H2, Intimin  $\beta 1$  (86,7 %); je ein Milch- und ein Humanisolat.
- Cluster IV Ont:H21, Intimin  $\theta/\gamma 2$  (89,2 %); ein Fleisch- und zwei Humanisolate.
- Cluster V O33:H6, Intimin  $\beta 2$  (90,3 %); ein Fleisch- und ein Humanisolate.

Bei den Isolaten O103:H2 (Intimin  $\beta 1$  und  $\epsilon$ ) konnte keine Verwandtschaft festgestellt werden. Im Gegensatz dazu schienen die drei Isolate Ont:H21 derselben klonalen Gruppe zu entstammen, da sie 89,2 % Übereinstimmungen teilten. Wiederum wurde keine Verbindung zwischen diesen Ont:H21-Stämmen mit dem O91:H21-Isolat gefunden.

Anhand der PFGE-Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass nicht nur 31 Serovare von insgesamt 139 EPEC-Isolaten aus Lebensmittel und vom Menschen übereinstimmen, sondern weiterhin 12 davon einer gemeinsamen klonalen Gruppe zuzuordnen sind. Dieses Ergebnis kann als Hinweis darauf gelten, dass mit EPEC kontaminierte Lebensmittel am Infektionsgeschehen des Menschen beteiligt sind und somit ein Gefährdungspotential nicht ausgeschlossen werden kann.

Folgende zwei Virulenzfaktoren wurden bei den EPEC-Isolaten festgestellt: Enterohämolysin bei 8 Isolaten (5,8 %), hitzstabiles Enterotoxin (EAST 1) bei 9 (6,5 %).

Die Serovare, die das **Enterohämolysin (Ehly)** beherbergten, waren O26:H11/H- (zwei aus Stuhlproben und zwei aus Lebensmitteln), O103:H2, O156:H-, O157:H- (jeweils einmal vom Menschen) und O177:H11 (Lebensmittel). Diese Serovare gehörten ausschließlich zur Gruppe der atypischen EPEC. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei diesen Isolaten um Serovare handelte, die häufig mit HUS-verursachenden EHEC in

Zusammenhang stehen (Bielaszewska et al. 2008; Kaper et al. 2004; Beutin et al. 2004; Mellman et al. 2008).

Vergleichbare Aussagen liegen von anderen Autoren vor. So fanden Aidar-Ugrinovich et al. (2007) O26:H11 und O177:H11 *hly*-positive-EPEC bei Rindern, sowie Krause et al. (2005) bei Haustieren und Bielaszewska et al. (2005, 2007c) bei Menschen. Die Arbeitsgruppe von Bielaszewska (2005, 2007a, 2007b, 2007c) beschäftigte sich mit der genomischen Untersuchung von **O26:H11/H-** Serovaren, die sowohl zu EHEC als auch zu atypischen EPEC gehören können. Sie stellten fest, dass bei diesen zwei *E. coli*-Pathogruppen der größte Teil der Genome identisch ist, wobei die aEPEC keine Shigatoxin-Gene enthalten. Weiterhin schlugen sie vor, dass sich ein beidseitiger Austausch von *stx*-Genen im Rahmen ihrer Evolution ereignet hat. *In vivo* Studien von Mellman et al. (2005) während des HUS-Krankheitsverlaufs brachten den Nachweis von O26:H11 *eae*-positiven *stx*-negativen Stämmen im Zusammenhang mit HUS bei Nachuntersuchungen von Stuhlproben, wobei bei Untersuchungen am Anfang der Krankheit die Shigatoxine nachgewiesen wurden. Anjum et al. (2003) vertraten die Meinung, dass atypische O26-EPEC-Stämme als Zwischenstadium von EPEC und EHEC betrachtet werden sollten.

Beutin et al. (2005b) beschäftigten sich mit der Untersuchung der neuen **O177** *E. coli*-Pathovare bei Menschen, Tieren und Lebensmitteln und bestätigten *hly*-positive-EPEC O177:H11 ebenfalls bei Rindern und Kälbern. Das Serovar **O103:H2** wurde bei zwei EPEC humanen Ursprungs bestätigt. Jedoch nur ein Stamm davon (mit einem  $\epsilon$ -Intimin) trug das Enterohämolysin-Gen. Beutin et al. (2005a) ermittelten identische Merkmale bei O103:H2-STEC-Stämmen.

Andererseits bestätigten Friedrich et al. (2007) und Feng et al. (2001) **O157:H-** *stx*-negative und *hly*-positive Stämme bei Menschen. Stämme, die zu Serovar O157:H7 gehören, werden als klassische Vertreter der Gruppe der EHEC angesehen (Karch et al. 2005). Der Abwesenheit bzw. der Verlust der Shigatoxine bei EHEC O157:H7/H- während des Infektionsgeschehens wurde von manchen Autoren beschrieben (Feng et al. 2001; Friedrich et al. 2007; Wenzel und Lejeune 2007, Regua-Mangia et al. 2008). In der vorliegenden

Arbeit wurde eines dieser Serovare in einer Probe humanen Ursprungs bestätigt.

Friedrich et al. (2007) vertraten die Meinung, dass manche atypische EPEC-Stämme (O26:H11/-, O157:H7/H-, O103:H2) als Varianten von EHEC ohne Toxine-Produktion zu betrachten sind. Der Grund zu dieser Annahme rührt aus der Fähigkeit dieser Stämme, ihre Virulenz aufrechtzuerhalten (Mellman et al. 2005; Bielaszewska 2005, 2007a, 2007b, 2007c). Donnenberg und Whittam (2001) beschäftigten sich mit der Untersuchung der evolutionären Beziehungen zwischen den klonalen Gruppen von EHEC und aEPEC. Sie vermuteten die Aufnahme von Shigatoxine durch manche atypischen EPEC-Stämme im Rahmen ihrer Evolution, was die Entstehung von EHEC zu Folge hatte.

Das **hitzstabile Enterotoxin (EAST1)** wurde in Studien von EPEC-Ausbrüchen aus Japan als wichtiger Virulenzfaktor ermittelt (Nishikawa et al. 2002; Yatsuyanagi et al. 2002, 2003; Zhou et al. 2002; Saito et al. 2005). In dieser Arbeit wurde das Enterotoxin bei den EPEC-Isolaten O45:H- und O168:H6 (aus Lebensmittel) sowie O49:H- (1x), O128:H2 (2x), O156:H8 (2x) und O157:H45 (2x, von Menschen) bestätigt, was 6,5 % der EPEC-Isolate entsprach. Manche Autoren haben das *astA*-Gen bei EPEC-Isolaten von Menschen untersucht. So fanden Jensen et al. (2007) EAST1 bei durchschnittlich 54 % der isolierten EPEC von erkrankten Personen und bei ungefähr 25 % von den gesunden Kontrollen und schlugen seine Bedeutung für die Identifizierung möglicher virulenter Stämme vor. Dagegen berichteten Robins-Browne et al. (2004) von zwei *astA*-positiven bei 100 atypischen Humanisolaten.

Die pathogene Rolle des Enterohämolytins und des hitzestabilen Enterotoxins bei EPEC-Infektionen ist noch unklar. Einerseits kann die Untersuchung dieser Faktoren bei der Charakterisierung eines Virulenzprofiles der vorkommenden Serovare helfen. Andererseits können die evolutionären Beziehungen zwischen EPEC und anderen *E. coli*-Pathovaren wie EHEC bzw. EAggEC erhellen. Die Analyse von weiteren Virulenzfaktoren in der erweiterten Routinediagnostik der EPEC-Keime ist deshalb im Hinblick auf weitergehende wissenschaftliche Erkenntnisse zu diesen Fragestellungen zu empfehlen (Cantarelli et al. 2000;

Jensen et al. 2007). Für die Routinediagnostik ohne wissenschaftlichen Hintergrund stützen die derzeit vorliegenden Ergebnisse die Hypothese, dass eine Differenzierung zwischen EPEC und EHEC anhand der Intimincharakterisierung oder Bestimmung anderer Virulenzfaktoren **nicht** möglich ist und eine Eingruppierung ausschließlich auf dem Nachweis der An- oder Abwesenheit der Shigatoxine beruhen muss.

## 6 Zusammenfassung

Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) sind weltweit als Auslöser für Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern bekannt. Sie können charakteristische „*attaching and effacing*“ (a/e) Läsionen in der Darmschleimhaut hervorrufen und bilden keine Shigatoxine. Die bedeutendsten Infektionswege für EPEC sind, außer der Mensch-zu-Mensch-Übertragung, kontaminierte Lebensmittel und Wasser. EPEC gelten als mögliche Auslöser Lebensmittel-assoziiertes Erkrankungen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz von EPEC-Isolaten in Lebensmitteln sowie in Oberflächen- und Trinkwasser festzustellen. Stuhlproben wurden ebenfalls untersucht, um die Isolate auf Gemeinsamkeiten hin zu überprüfen.

Von November 2006 bis Dezember 2008 wurden 636 Lebensmittelproben, 176 Oberflächen- und 43 Trinkwasserproben mittels Real-Time-PCR auf das Vorliegen des *eae* (*E. coli* attaching and effacing)-Gens untersucht. Parallel zu diesen Analysen wurden die Daten aus der Routinediagnostik von Stuhlproben von 2006 bis 2008 ausgewertet. Dabei wurden EPEC-positive Mischkulturen mittels Kolonieblothybridisierung isoliert und serotypisiert. Anschließend folgte die Charakterisierung der Isolate auf verschiedene Virulenzfaktoren hin: *bundle-forming pilus* (*bfpA*) und Enterohämolysin (*hly*) durch Real-Time-PCR und Subtypisierung der Intimin Varianten (*eae*) und Enterotoxin (EAST1) mit konventioneller PCR und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Um mögliche klonale Verbindungen zwischen den Isolaten festzustellen, wurde eine Pulsfeld-Gelelektrophorese-Analyse (PFGE) durchgeführt.

Bei 4,1 % der Lebensmittelproben sowie bei 31,3 % der Oberflächenwasser- und 2,3 % der Trinkwasserproben wurde das *eae*-Gen nachgewiesen. 25 % der auf EPEC untersuchten Stuhlproben waren positiv. Die Isolierung der Bakterien gelang aus 20 Lebensmitteln, 6 Wasserproben und 113 Stuhlproben. Übereinstimmungen zwischen Isolaten aus Lebensmitteln und Wasser und von Personen konnte punktuell durch die phäno- und genotypische Charakterisierung sowie durch PFGE bestätigt werden.

## 7 Summary

### **Prevalence and characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates of food, water and human origin.**

Enteropathogenic *Escherichia coli* are worldwide known as a cause of diarrhea in infants and children. These pathogens are able to induce characteristic “attaching and effacing” lesions in intestinal epithelium but not to produce shiga toxins. The most important sources of infection with EPEC, apart from people-to-people transmission, are food or water. Therefore EPEC can be considered as a food-borne pathogen.

The aim of this work was to determinate the prevalence of EPEC in food as well as in surface and drinking water. Additionally, samples from the routine diagnostic of patients were analyzed, which enabled the comparison between strains from both origins.

Six hundred and thirty-six food, 176 surface and 43 drinking water samples were screened from November 2006 until December 2008 for the presence of the *eae*-gene (*E. coli* attaching and effacing) with real time PCR methods. Data of stool samples from patients of 2006, 2007 and 2008 from the routine diagnostic were simultaneously examined.

EPEC positive samples were isolated with colony blot hybridization and serotyped. Afterwards the isolates were tested for different virulence factors, including *bundle forming pilus (bfpA)* and Enterohemolysin (*hly*) with real time PCR as well as subtyping of Intimin and presence of enterotoxin with PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Puls Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis was accomplished in order to determine clonal connections between the strains.

The *eae*-gene was detected in 4,1 % of the food, 31,1 % of the surface water and 2,3 % of the drinking water samples. Twenty-five percent of the stool samples were found positive.

Strains could be isolated from 20 food, 6 water and 113 stool positive samples. Phenotypic and genotypic characterization and Pulse Field Gel Electrophoresis procedures allowed us to find coincidences between food or water and people strains.

## 8 Resumen

### **Prevalencia y caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatógenos (EPEC) procedentes de alimentos, aguas y personas**

Los *Escherichia coli* enteropatógenos (EPEC) se caracterizan, a nivel mundial, por causar diarreas en lactantes y en niños pequeños. Estos gérmenes pueden causar lesiones intestinales de tipo fijación y borramiento (“attaching and effacing”) pero no producen toxinas Shiga. La forma de transmisión más común la fecal-oral pero también pueden transmitirse por medio de alimentos o agua contaminados, con lo que se pueden considerar como vectores implicados en intoxicaciones alimentarias.

Un objetivo de este trabajo ha sido búsqueda de EPEC en alimentos y en agua. Paralelamente se han analizado datos del diagnóstico de rutina de heces de pacientes, lo que ha permitido la comparación de las cepas de ambos orígenes. Desde noviembre del 2006 hasta diciembre del 2008 se han analizado 636 alimentos, 176 muestras de aguas de recreo y 43 de aguas para consumo para la detección del gen *eae* (*E. coli* attaching and effacing) con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. También se analizaron los datos del diagnóstico de estas bacterias en pacientes durante los años 2006, 2007 y 2008 a partir de datos del diagnóstico de rutina.

Los cultivos mixtos positivos fueron aislados mediante hibridación y posteriormente serotipados. Finalmente diferentes factores de virulencia han sido caracterizados en los aislamientos: *bundle-forming pilus* (*bfpA*) y entrohémolisina mediante PCR a tiempo real, tipado de variantes de intimina y enterotoxina mediante PCR y restricción (RFLP). Para determinar posibles relaciones clonales entre las cepas, éstas fueron analizadas por medio de la técnica de electroforesis en campos pulsantes (PFGE).

El gen *eae* fue detectado en un 4,1 % de las muestras de alimentos, 31,1 % de las aguas de recreo y 2,3 % del agua potable, así como en un 25 % de las muestras de heces de pacientes. El aislamiento tuvo lugar en 20 muestras positivas de alimentos, 6 de aguas de recreo, un agua potable y 113 heces. Gracias al tipado genotípico y fenotípico de las cepas, así como la PFGE, han podido encontrarse asociaciones entre cepas procedentes de alimentos y agua con cepas aisladas de personas.

## 9 Anhang

### 9.1 Material und Methoden

#### Allgemeine Materialien

##### Handschuhe

- Safeskin Satin Plus powder-free latex exam gloves, Size S, REF SP 2220E (Fa. Kimberly-Clark, USA)
- Safeskin Purple Nitrile powder-free exam gloves, Size S, REF 52001M. (Fa. Kimberly-Clark, USA)

##### Pipetten (Fa. Eppendorf, Deutschland)

- Eppendorf Reference 0,5 - 10 µl Nr. 432063
- Eppendorf Reference 2-20 µl Nr. O64682
- Eppendorf Reference 10 - 100 µl Nr. 115901
- Eppendorf Reference 100 -1000 µl Nr. 1487282
- Eppendorf Multipipette<sup>®</sup> plus

##### Pipettenspitzen (Fa. Eppendorf, Deutschland)

- ep T.I.P.S. filter PCR clean Nr. 0030 007.040 10 µl
- ep T.I.P.S. filter PCR clean Nr. 0030 077.067 100 µl
- ep T.I.P.S. filter PCR clean Nr. 0030 077.105 1000 µl
- ep T.I.P.S. filter reload Nr. 0030 073.800 2 - 200 µl
- Eppendorf Combitips plus Nr. 0030 069.463 10 ml
- Eppendorf Combitips plus Nr. 0030 069-455 50 ml

## **Anzucht und Bearbeitung von EPEC**

### **Anreicherung und Anzucht**

- Novobiocin-Lösung (SIGMA<sup>®</sup>-ALDRICH CHEMIE GmbH)
- Glasflaschen (Schott)
- Glasröhrchen
- Brutraum, 37 °C
- Wattetupfer, WA 1-I (Herenz)
- Metallösen
- Bunsenbrenner, Gasprofi 2 (WLD-TEC)
- Müller-Hinton-Agarplatten, Art.-Nr. CM 337 (Oxoid)
- ENDO-Agarplatten, Art-Nr. CM 479 (Oxoid)
- Lactose-TTC-Agar mit Tergitol<sup>®</sup>, Art. Nr. 10768005000 (Merk KgaA, Darmstadt)
- Modifiziertes Tryptose-Soja-Bouillon (mTSB)
  - 30,0 g mTSB
  - 1,5 g Gallensalze Nr. 3
  - 1,5 g Dikaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
  - Aqua destilada ad 1000 ml

### **Stammhaltung der EPEC Stämme**

- Cryoröhrchen Nr. 791701 (Mast Diagnostica)
- Gefrierschrank - 80 °C Nr. 51014463 (Kendro)

### **PCR- und RFLP-Verfahren**

#### **Real-Time-PCR**

##### MasterMix

- Biopur<sup>®</sup> Safe-Lock Eppendorf Tubes farblos, einzeln verpackt 2 ml, 100 St. Nr. 0030 121.597 (Eppendorf)
- AmpuWa<sup>®</sup> Wasser, DNase-frei, 2 ml (Fresenius Kabi GmbH)
- Primer (Eurofins MWG GmbH, Deutschland; TibMolbiol GmbH)
- Sonden (Eurofins MWG GmbH, Deutschland; TibMolbiol GmbH)
- LightCycler Fast Start HybProbe DNA Master Kit, 04957 199702 (Roche)

## Geräte

- LightCycler Capillaries 20µl Kat. Nr. 1 909 339 (Roche)

## LightCycler 1

- LightCycler Carousel Centrifuge (Roche)
- LightCycler Nr. 1403282 (Roche)
- Computer HP Vestra VL, mit Auswertungssoftware LC Software Version 3.5 (Roche)

## LightCycler 2

- LightCycler Carousel Centrifuge 2.0 (Roche)
- LightCycler 2.0 Nr. 1406360 (Roche)
- Computer HP Vestra VL, mit Auswertungssoftware LC Software Version 3.5 (Roche)

## **Konventionelle PCR**

### Master Mix

- Biopur<sup>®</sup> Safe-Lock Eppendorf Tubes farblos, einzeln verpackt 2 ml 100 St. Nr. 0030 121.597 (Eppendorf)
- MgCl<sub>2</sub> Puffer aus LightCycler Fast Start HybProbe DNA Master Kit, 04957 199702 (Roche)
- GeneAmp<sup>®</sup> dNTP-Mix, N808-0007, 10nMol dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems)
- Primer (Eurofins MWG GmbH, Deutschland; TibMolbiol GmbH, Deutschland; Invitrogen USA)
- AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase mit GeneAmp<sup>®</sup> 10xPCR Puffer, N808-0152 (Applied Biosystems)
- 5 x Green Go Taq<sup>®</sup> Flexi Buffer Polymerase (1U) (Bioline)
- PCR Softstrips 0.2 ml, gelb. Farb Art.Nr. 710988 (Biozym Scientific GmbH)

## Geräte

- MasterCycler gradient Serial Nr.5333 (Eppendorf)

## Auswertung

### a. Gelherstellung

- peqGOLD Universal Agarose, 500g Nr. 35-1020 (Fa. peqlab)
- Analysenwaage KERN EW max 1500 g, min 0,05g (Kern)
- Mikrowelle (Siemens)
- TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA), Stammlösung 5 x TBE
  - 54,0 g Tris-Base (Trizma® Base 1kg, T-8524) (Sigma-Aldrich)
  - 27,5 g Borsäure H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Art.Nr. 6943.1 (Roth)
  - 3,72 g EDTA-Na<sub>2</sub>, 250 g, Art.-Nr. 8043.1 (Roth)
  - Aqua dest. ad 1000 ml
- Gebrauchslösung: 1x TBE (1 Teil Stammlösung und 4 Teile Aqua dest.)
- Gelkammer (Biorad)
- Kämme 10, 15 und 20 Well (Biorad)

### b. Elektrophorese

- pUC 8; 0,5 mg DNA/mol SM0301 (Fermentas MBI)
- O´GeneRuler 100bp ready-to-use; 0,1 µg/µl SM1153 (Fermentas MBI)
- Mikrotiterplatten (Sarstedt)
- Elektrophorese-Kammer SUB-CELL® (Biorad)
- Stromquelle POWER PAC 300 (Biorad)

### c. Färbung und Auswertung

- Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml, Art. 2218.1 (Roth)
- Safeskin Satin Plus powder-free Purple nitrile exam gloves, Size M, REF 52002M (Fa. Kimberly-Clark, USA)
- UV-Kammer mit integrierter Kamera Gel-Doc 1000 (Biorad, Deutschland)
- Computer mit Auswertungssoftware Molecular Analyst 1.5 (Biorad)
- Drucker Mitsubishi Video Copy Processor PG 6 DE (Mitsubishi, Japan)

## **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus**

*Pst*I 140S 10.000units, 20000U/ml und 10 x NE Puffer 3 (New England Biolabs, USA)

## Hybridisierungstechniken

### Sondenherstellung

- Sodium acetate Buffer Solution 3M 0,2µl filtered (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- Ethanol Art. Nr. 5054,3 (Roth)
- PCR DIG Probe Synthesis Kit, Cat. No. 11 636 090 910, (Roche) Gefäße1, 2 und 3
- MinElute Gel Extraktion Kit, Best. Nr. 28604 (Quiagen GmbH)
- Skalpell
- Schutzbrille
- 2-Propanol Nr. 1096341000 (Merck)
- Biotransfer A Transfer Membranen, Disc 0,082 m, 1,2 µm (BioSupport Division Pall GmbH Filtrationstechnik)
- GS Gene Linker<sup>®</sup>UV Chamber (Biorad)
- DIG Wasch and Block Puffer Set, Cat. No: 1585762 (Roche), enthält die Komponenten für Waschpuffer und Puffer 2.
- Schüttler Promax 1020 (Heidolph)
- Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragments 150 U, Cat.-No: 11 093274910 (Roche)
- NBT/BCIP ready-to-use tablets, 20 tablets, Cat.-No: 11 697471001 (Roche)
- Petrischale
- Destilliertes Wasser
- DIG Easy Hyb<sup>®</sup>, 500 ml, Cat.-No: 1603558 (Roche)

### Kolonieblothybridisierung

- Safe-Lock Eppendorf Tubes farblos 1,5 ml, 1000 St. Nr. 0030 120.086 (Eppendorf)
- isotonische Kochsalzlösung 0,9 % Braun, 250 ml (Braun Melsungen AG)
- Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Drigalski-Glasspateln
- Schüttler Thermorüttler Unimax 1010 (Heidolph)

- Hybridisierungsöfen (Heraeus Instruments)
- Hybridisierungsgefäße mit Schraubverschluss GL45 (Schott)
- Flaschen (Schott)
- Erlenmeyer-Kolben (Schott):
- Gel Blotting Papier Art. 4928.1, 100 St, 580 x 600 mm (Roth)
- Eis

#### Benötigte Lösungen

- Denaturierungslösung, 1000 ml:
  - 20 g, c = 0,5 mol/l NaOH, ca. 12 % Cl-aktiv, Best.-Nr. 055 (Biesterfeld Chemie distribution GmbH u. Co. KG)
  - 87,66 g, c = 1,5 mol/l Natriumchlorid, BDH AnalaR<sup>®</sup> Prod. 102415, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
  - 0,2 % Triton X100/ 0,5 NaOH, 1000 ml:
  - 2 ml Triton X-100
  - 20 g, c = 0,5 mol/l NaOH ca. 12 % Cl-aktiv, Best.-Nr. 055 (Biesterfeld Chemie distribution GmbH u. Co. KG)
  - 1000 ml Aqua dest.
- Neutralisationslösung (pH = 7,5), 1000 ml:
  - 121,1 g, c = 1,0 MOL/L tris, 100 x Concentrate: 0,2 µm filtered, T-9285, 100 ml (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 87,66 g, c = 1,5 mol/l Natriumchlorid, BDH AnalaR<sup>®</sup> Prod. 102415, 58,44 g/mol, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
  - 1000 ml Aqua dest.
- Äquilibrierungslösung (pH = 7.0), 20 x SSC, 1000 ml:
  - 175 g, c = 3 mol/l Natriumchlorid, BDH AnalaR<sup>®</sup> Prod. 102415, 58,44 g/mol, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
  - 88 g, c = 0,3 mol/l TRIS, 199 x Concentrate: 0.2 µm filtered, T-9285, 100 ml (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 1000 ml Aqua dest.

Zur Herstellung der Gebrauchslösungen wird diese Stammlösung entsprechend verdünnt.

- Waschlösung 1 (2x SSC, 1 % SDS), 1000 ml
  - 100 ml,  $\rho = 1$  g/l SDS, 10 % Solution: 0.2  $\mu\text{m}$  filtered, L-4522, 100ml (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 100 ml 20 x SSC-Lösung
  - 800 ml Aqua dest.
- Waschlösung 2 (2x SSC, 0,1 % SDS), 1000 ml
  - 10 ml,  $\rho = 1$  g/l SDS, 10 % Solution: 0.2  $\mu\text{m}$  filtered, L-4522, 100ml (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 100 ml 20 x SSC-Lösung
  - 890 ml Aqua dest.
- Waschlösung 3 (2x SSC, 1 % SDS), 1000 ml
  - 10 ml,  $\rho = 1$  g/l SDS, 10 % Solution: 0.2  $\mu\text{m}$  filtered, L-4522, 100ml (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 25 ml 20 x SSC-Lösung
  - 965 ml Aqua dest.
- Puffer 1 (Maleinsäurepuffer, pH = 7,5), 1000 ml:
  - 11,6 g Maleinsäure
  - 8,76 g Natriumchlorid, BDH AnalaR<sup>®</sup> Prod. 102415K, 58, 44 g/mol, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
  - 900 ml Aqua dest.

pH-Wert mit 2N NaOH einstellen und danach auf 1000 ml auffüllen

- Puffer 2 (Blöckinglösung), 1000 ml
  - 100 ml von Reagenzgefäße 1 des DIG Wasch and Block Puffer Sets
  - 900 ml Puffer 1
- Puffer 3 (Detektionspuffer, pH = 9,5), 1000 ml
  - 15,76 g TRIS, TRIZMA<sup>®</sup> Base, T-8524, 1 kg (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 5,85 g Natriumchlorid, BDH AnalaR<sup>®</sup> Prod. 102415K, 58, 44 g/mol, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
  - 900 ml Aqua dest.

pH-Wert mit 2N NaOH einstellen und danach auf 1000 ml auffüllen

- TE-Puffer (pH = 8,0)
  - 10 ml TRIS-EDTA-Puffer, cc=1,0 mol/l TRIS, 100 x Concentrate: 0.2 µm filtered, L-4522, 100ml (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 25 ml 20 x SSC-Lösung
  - 900 ml Aqua dest.

### **Pulsfeld-Elektrophorese**

Proteinase K 1ml (600U/ml, 20mg/ml). Ref. EO-0492 (Fermentas Life Sciences)

XbaI (10U/µl) 20000U. Ref. 674273 (Roche)

Buffer H 1ml. Ref. 1417991 (Roche)

Seakem Gold Agarose for PFGE 125 g. Ref. 50150 (Cambrex)

- CBS-Puffer
  - 12,11 g Tris-Base (Trizma<sup>®</sup> Base 1 kg, T-1503) (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - 37,22 g EDTA 250 g, RefK32319118 (Merk)
  - Aqua dest. ad 1000 ml
- TE-Puffer
  - 1,21 g Tris
  - 0,37 g EDTA
  - Aqua dest. ad 1000 ml
- SDS 10 %
  - 10 g Sodium lauryl sulfate, 95 %. Ref. SO 0450 (Sharlab)
  - 100 ml Aqua dest
- Lysis-Puffer
  - 6,05 g Tris
  - 18,61 g EDTA
  - 10 g Sarkosyl: N-Lauroyl-sarcosine sodium salt. Ref L-5125 (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
  - Aqua dest. ad 1000 ml
- TBE-Puffer (x0,5)
  - 100 ml TBE-Puffer (5x) 4 l Cat. Nr. 8549 (Pronadisa)
  - 900 ml Aqua dest.
- TBE-Puffer (x0,5) mit Thiourea

- 782 µl Thiourea. Ref. 094K0086 (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- 200 ml TBE-Puffer (5x)
- 1800 ml Aqua dest.

## 9.2 Ergebnisse

Tabelle 31: Verwendete Referenzstämme für die Prüfung der Selektivität zur Differenzierung der atypischen und typischen EPEC

### 1. Pathovare von *Escherichia coli*

<b><i>E. coli</i>-Pathovar</b>	<b>Stamm</b>	<b>Herkunft</b>
STEC	E57	Uni. Würzburg
EHEC	T4/97	Uni. Würzburg
EHEC	EH250	Uni. Würzburg
EHEC	E32511	LGL
EHEC	6592/02	LGL
EHEC	MHI 813	LGL
EHEC	-	Uni. Münster
EHEC	-	Uni. Münster
EHEC	TU1	TUM
EHEC	TU2	TUM
EHEC	EDL933	TUM
EAEC	17-2	Uni. Münster
EAEC	-	Uni. Münster
EAEC	4140-86	Hyg Inst MM, Hamburg
EIEC	98-10282	RKI
EIEC	76-5	Uni. Würzburg
EIEC	-	TUM
EIEC	12860	Uni. Würzburg
ETEC	117/86	Uni. Würzburg
ETEC	147/1	Uni. Würzburg
ETEC	G1253	Uni. Würzburg
ETEC	86-117	RKI
<i>E. coli</i>	K-12/I	LGL
<i>E. coli</i>	K-12/II	LGL
<i>E. coli</i>	TU3	TUM

TUM: Technische Universität München

- : Keine Angaben

## 2. Enterobacteriaceae

<b>Spezies</b>	<b>Stamm</b>	<b>Herkunft</b>
<i>Serratia marcescens</i>	30121	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Edwadsiiella tarda</i>	30052	DSMZ
<i>Hafnia alvei</i>	30163	DSMZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	ATCC
<i>Proteus mirabilis</i>	788	DSMZ
<i>Proteus vulgaris</i>	PE 502	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Shigella dysenteriae</i>	PE 50	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Shigella sonnei</i>	PE 53	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Shigella flexneri</i>	4782	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Shigella boydii</i>	PE 53	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Enterobacter aerogenes</i>	PE 276	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Enterobacter sakazakii</i>	4485	DSMZ
<i>Yersinia intermedia</i>	PE 274	Genescan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4780	DSMZ
<i>Citrobacter freundii</i>	30039	LGL
<i>Salmonella cerro</i>	O18	LGL
<i>Salmonella typhimurium</i>	O5	LGL

DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

ATCC: American Type Culture Collection, USA

## 3. Typische und atypische Stämme

<b>Typische EPEC-Stämme</b>	
<b>Stamm</b>	<b>Herkunft</b>
EPEC-TU	TUM
O111:H2, 1755/85	TUM
2348III Nr.1	Uni. Münster
2348III Nr.2	Uni. Münster

## Charakterisierung der EPEC-Stämme

Tabelle 32: Merkmale von EPEC-Isolaten aus Lebensmitteln, Wasser und Menschen

Serovar	Herkunft	<i>hly</i>	<i>bfp</i>	<i>astA</i>	EAF	Intimin
<b>O2:H-</b>	Human	-	-	-	-	α2
<b>O5:H40</b>	Vorzugsmilch	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O8:H19</b>	Wasser	-	-	-	-	η
<b>O8:H49</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>O23:H8</b>	Human	-	+	-	-	θ/γ2
<b>O23:H8</b>	Rehfleisch	-	+	-	-	θ/γ2
<b>O25:H2</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>O26:H-</b>	Vorzugsmilch	+	-	-	-	β1
<b>O26:H-</b>	Vorzugsmilch	+	-	-	-	β1
<b>O26:H11</b>	Human	+	-	-	-	β1
<b>O26:H11</b>	Human	+	-	-	-	β1
<b>O33:H6</b>	Human	-	-	-	-	β2
<b>O33:H6</b>	Wildschweingulasch	-	-	-	-	β2
<b>O33:H6</b>	Human	-	-	-	-	β2
<b>O35:H2</b>	Steinlindenblütentee	-	-	-	-	β1
<b>O39:Hnt</b>	Human	-	-	-	-	n.t.
<b>O40:H2</b>	Vorzugsmilch	-	-	-	-	β1
<b>O45:H-</b>	Rucola	-	-	+	-	α1
<b>O49:H-</b>	Human	-	-	+	-	κ
<b>O51:H49</b>	Human	-	-	-	-	α1
<b>O51:H49</b>	Human	-	-	-	-	α1
<b>O51:H-</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>O55:H7</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>O55:H7</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>O55:H7</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>O55:H7</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>O60:H-</b>	Wasser	-	-	-	-	ε
<b>O69:H-</b>	Human	-	-	-	-	ζ
<b>O76:H7</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O76:H7</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O84:H-</b>	Human	-	-	-	-	n.t.
<b>O88:H-</b>	Human	-	-	-	-	ι
<b>O88:H25</b>	Wasser	-	+	-	-	η
<b>O91:H6</b>	Human	-	-	-	-	ι
<b>O91:H6</b>	Human	-	-	-	-	ι
<b>O91:H6</b>	Human	-	-	-	-	ι

Fortsetzung Tabelle 32

<b>Serovar</b>	<b>Herkunft</b>	<b><i>hly</i></b>	<b><i>bfp</i></b>	<b><i>astA</i></b>	<b>EAF</b>	<b>Intimin</b>
<b>O91:H6</b>	Human	-	-	-	-	ε
<b>O91:H21</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O91:H40</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O98:H8</b>	Human	-	-	-	-	ι
<b>O98:H-</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O103:H2</b>	Wurst	-	-	-	-	β1
<b>O103:H2</b>	Human	+	-	-	-	ε
<b>O105:H4</b>	Human	-	-	-	-	κ
<b>O105:H4</b>	Human	-	-	-	-	κ
<b>O105:H4</b>	Human	-	-	-	-	κ
<b>O105:H7</b>	Rohmilch	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O113:H6</b>	Human	-	-	-	-	β2
<b>O113:H6</b>	Human	-	-	-	-	β2
<b>O113:H6</b>	Human	-	-	-	-	β2
<b>O113:H6</b>	Human	-	-	-	-	β2
<b>O113:H6</b>	Human	-	-	-	-	β2
<b>O114:H40</b>	Brennesselblätterttee	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O118:Hnt</b>	Human	-	+	-	-	κ
<b>O123:H19</b>	Human	-	-	-	-	η
<b>O123:H19</b>	Human	-	-	-	-	η
<b>O123:H19</b>	Human	-	-	-	-	η
<b>O123:H19</b>	Human	-	-	-	-	η
<b>O127:H2</b>	Trinkwasser	-	-	-	-	β1
<b>O127:H40</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O127:H40</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O127:H40</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O127:H40</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O127:H40</b>	Wasser	-	-	-	-	θ/γ2
<b>O128:H2</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>O128:H2</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>O128:H2</b>	Vorzugsmilch	-	-	-	-	β1
<b>O128:H2</b>	Human	-	-	+	-	β1
<b>O128:H2</b>	Human	-	-	+	-	β1
<b>O128:H2</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>O128:H2</b>	Rohmilch	-	-	-	-	β1
<b>O132:H34</b>	Human	-	-	-	-	α2
<b>O132:H34</b>	Human	-	-	-	-	α2
<b>O136:H1</b>	Human	-	-	-	-	ι
<b>O139:Hnt</b>	Human	-	-	-	-	β2

Fortsetzung Tabelle 32

<b>Serovar</b>	<b>Herkunft</b>	<b><i>hly</i></b>	<b><i>bfp</i></b>	<b><i>astA</i></b>	<b>EAF</b>	<b>Intimin</b>
<b>O139:H14</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O139:H14</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O139:H14</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O139:H14</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O139:H14</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O139:H14</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O142:H34</b>	Human	-	-	-	-	$\alpha$ 1
<b>O142:H34</b>	Human	-	-	-	-	$\alpha$ 1
<b>O142:H34</b>	Human	-	-	-	-	$\alpha$ 1
<b>O142:H34</b>	Human	-	-	-	-	$\alpha$ 1
<b>O145:H34</b>	Human	-	-	-	-	I
<b>O145:H34</b>	Human	-	-	-	-	I
<b>O149:H-</b>	Human	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O153:H7</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 1
<b>O153:H21</b>	Human	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 1
<b>O153:H21</b>	Human	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Rohmilch	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Vorzugsmilch	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Vorzugsmilch	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Vorzugsmilch	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Human	-	-	+	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Human	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Human	-	-	+	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H8</b>	Human	-	-	-	-	$\theta/\gamma$ 2
<b>O156:H-</b>	Human	+	-	-	-	$\zeta$
<b>O157:H-</b>	human	+	-	-	-	$\gamma$ 1
<b>O157:H45</b>	Human	-	+	+	+	$\alpha$ 1
<b>O157:H45</b>	Human	-	+	+	+	$\alpha$ 1
<b>O167:H-</b>	Human	-	-	-	-	$\zeta$
<b>O167:Hnt</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 1
<b>O167:Hnt</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 1
<b>O167:Hnt</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 1
<b>O168:H6</b>	Feldsalat	-	-	+	-	$\beta$ 2
<b>O177:H6</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O177:H6</b>	Human	-	-	-	-	$\beta$ 2
<b>O177:H11</b>	Vorzugsmilch	+	-	-	-	$\beta$ 1
<b>O179:H31</b>	Human	-	-	-	-	$\zeta$
<b>O179:H31</b>	Human	-	-	-	-	$\zeta$
<b>O179:H31</b>	Human	-	-	-	-	$\zeta$

Fortsetzung Tabelle 32

<b>Serovar</b>	<b>Herkunft</b>	<b><i>hly</i></b>	<b><i>bfp</i></b>	<b><i>astA</i></b>	<b>EAF</b>	<b>Intimin</b>
<b>O179:H31</b>	Human	-	-	-	-	ζ
<b>Ont:H6</b>	Human	-	-	-	-	α2
<b>Ont:H6</b>	Human	-	-	-	-	α2
<b>Ont:H6</b>	Human	-	-	-	-	α2
<b>Ont:H6</b>	Human	-	-	-	-	α2
<b>Ont:H6</b>	Wasser	-	-	-	-	β2
<b>Ont:H21</b>	Rehfleisch	-	-	-	-	θ/γ2
<b>Ont:H21</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>Ont:H21</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>Ont:H21</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>Ont:H25</b>	Human	-	+	-	-	η
<b>Ont:H49</b>	Human	-	-	-	-	ι
<b>Ont:Hnt</b>	Human	-	-	-	-	θ/γ2
<b>ORF:H4</b>	Human	-	-	-	-	η
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	β1
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	ζ
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	n.t
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>Ont:H-</b>	Human	-	-	-	-	γ1
<b>Ont:Hnt</b>	Human	-	-	-	-	ζ

## Charakterisierung des Intiminproteins bei EHEC-Stämmen

Tabelle 33: Merkmale von EHEC-Isolaten aus Menschen

Serovar	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>hly</i>	Intimin
O26:H11	-	+	+	β
O77:H11	+	-	+	β
O80:H-	-	+	+	n.t.
O91:H-	+	+	+	α
O103:H2	+	-	+	ε
O103:H2	+	-	+	ε
O103:H11	+	-	+	β
O111:H8	+	+	+	θ/γ2
O111:H-	-	+	+	θ/γ2
O111:H-	+	+	+	θ/γ2
O121:H-	-	+	+	ε
O121:H19	-	+	+	ε
O145:H-	+	-	+	n.t.
O145:H-	-	+	+	θ/γ2
O145:H-	-	+	+	γ
O145:H-	+	+	-	ε
O156:H-	-	+	+	θ/γ2
O157:H-	+	+	+	γ
O157:H-	+	+	+	γ
O177:H-	+	-	-	α
O177:H11	+	-	+	β
Orf:H2	+	-	+	ε
Orf:H2	+	-	+	ε
Orauh:H2	+	-	+	ε
Ont:Hnt	-	+	+	γ

## 10 Literaturverzeichnis

- Abbar F, Kaddar HK (1991).  
Bacteriological studies on Iraqi milk products.  
J. Appl. Bacteriol. **71**, 497-500.
- Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G (1998a).  
Detection of Intimins  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ , Four Intimin Derivatives Expressed by Attaching and Effacing Microbial Pathogens.  
J. Clin. Microbiol. **36**, 662-668.
- Adu-Bobie J, Trabulsi L, Carneiro-Sampaio S, Dougan G, Frankel G (1998b).  
Identification of immunodominant regions within the C-Terminal cell binding domain of intimin  $\alpha$  and Intimin  $\beta$  from enteropathogenic *Escherichia coli*.  
Infect. Immun. **66**, 5643-5649.
- Afset J, Bergh K, Bevanger L (2003).  
High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea.  
J. Med. Microbiol. **52**, 1015-1019.
- Afset J, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K (2004).  
Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea.  
J. Med. Microbiol. **53**, 1137-1144.
- Afset J, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Andersen E, Bevanger L, Bergh K (2006).  
Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR.  
J. Clin. Microbiol. **44**, 3703-3711.
- Afset J (2007).  
Role of enteropathogenic *Escherichia coli* in childhood diarrhoea in Norway.  
Doctoral theses at Norwegian University of Science and Technology. Trondheim.
- Afset J, Andersen E, Bruant G, Harel J, Wieler L, Bergh K (2008).  
Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using Multilocus Sequence Typing and DNA microarray analysis.  
J. Clin. Microbiol. **46**, 2280-2290.

- Agin TS, Cantey JR, Boedeker EC, Wolf MK (1996).**  
Characterisation of the *eae* gene from rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain RDEC-1 and comparison to other *eae* genes from bacteria that cause attaching and effacing lesions.  
FEMS Microbiol. Lett. **144**, 249-258.
- Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, Mora A, Onuma DL, Silveira WD, Pestana de Castro AF (2007).**  
Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil.  
Int. J. Food Microbiol. **115**, 297-306.
- Aktan I, Sprigings KA, La Ragione RM, Faulkner LM, Paiba GA, Woodward MJ (2004).**  
Characterization of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales.  
Vet Microbiol. **102**, 43-53.
- Albert MJ, Faruque ASG, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D (1999).**  
Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh.  
J. Clin. Microbiol. **37**, 3458-3464.
- Aleixo J, Aver G (1996).**  
Prevalence of enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in foods of animal origin in southern Brazil.  
Ciência Rural, Santa Maria. **26**, 274-260.
- Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM (2006).**  
Detection and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea.  
J. Med. Microbiol. **55**, 1159-1163.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LMBG (2002).**  
Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildener *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik.  
Beuth Verlag, Berlin.
- Andersson M, Vondracek M (2008).**  
Real Time PCR detection of enterovirulent *Escherichia coli*.  
18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Barcelona, Spanien. 19. - 22. 04. 2008, 1979.
- Anjum MF, Lucchini S, Thompson A, Hinton JC, Woodward MJ (2003).**  
Comparative Genomic Indexing Reveals the Phylogenomics of *Escherichia coli* Pathogens.  
Infect. Immun. **71**, 4674-4683.

- Ansaruzzaman M, Albert, Nahar S, Byun R, Katouli, Kühn I, Möllby (2000).**  
Clonal groups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in case-control studies of diarrhoea in Bangladesh.  
J. Med. Microbiol. **49**, 177-185.
- Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA (2004).**  
Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp.  
J. Clin. Microbiol. **42**, 5849-5853.
- Araujo VS, Pagliarea VA, Queiroz ML, Freitas-Almeida CA (2002).**  
Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil.  
J. Appl. Microbiol. **92**, 1172-1177.
- Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabricotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, Scaletsky IC (2007).**  
Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children.  
J Clin Microbiol. **45**, 3396-3399.
- Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DCA, Moon HW (1983).**  
Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*.  
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **2**, 534-538.
- Barlow RS, Hirst RG, Norton RE, Ashhurst-Smith C, Bettelheim KA (1999).**  
A novel serotype of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) as a major pathogen in an outbreak of infantile diarrhea.  
J. Med. Microbiol. **48**, 1123-1125.
- Bauer M, Welch RA (1996).**  
Characterization of an RTX Toxin from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.  
Infect. Immun. **64**, 167-175.
- Beutin L, Prada J, Zimmermann S, Stephan R, Ørskov I, Ørskov F (1988).**  
Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC).  
Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. **261**, 266-279.
- Beutin L, Montenegro MA, Ørskov I, Ørskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R (1989).**  
Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*.  
J. Clin. Microbiol. **27**, 2559-2564.
- Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K (1994).**  
Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany.  
Med. Microbiol. Immunol. (Berlin). **183**, 13-21.

- Beutin L (1999).**  
*Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats.  
Vet. Res. **30**, 285-298.
- Beutin L, Marchés O, Bettelheim KA, Gleier K, Zimmermann S, Schmidt H, Oswald E (2003).**  
Hep-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia.  
Infect. Immun. **71**, 3995-4002.
- Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K (2004).**  
Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period.  
J. Clin. Microbiol. **42**, 1099-1108.
- Beutin L, Kaulfuss S, Herold S, Oswald E, Schmidt H (2005a).**  
Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and Puls-Field Gel Electrophoresis.  
J. Clin. Microbiol. **43**, 1552-1563.
- Beutin L, Kong Q, Feng L, Wang Q, Krause G, Leomil L, Jin Q, Wang L (2005b).**  
Development of PCR assays targeting the genes involved in synthesis and assembly of the new *Escherichia coli* O174 and O177 O Antigens.  
J. Clin. Microbiol. **43**, 5143-5149.
- Bielaszewska M, Zhang W, Tarr PI, Sonntag AK, Karch H (2005).**  
Molecular profiling and phenotype analysis of *E.coli* O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of EHEC and EPEC isolates.  
J. Clin. Microbiol. **43**, 4225-4228.
- Bielaszewska M, Sonntag AK, Schmidt M, Karch H (2007a).**  
Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26.  
Microb. Infect. **9**, 891-897.
- Bielaszewska M, Prager R, Köck R, Mellmann, Zhang W, Tschäpe H, Tarr PI, Karch H (2007b).**  
Shiga Toxin gene loss and transfer in vivo and in vitro during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans.  
Appl. Env. Microbiol. **73**, 3144-3150.
- Bielaszewska M, Zhang W, Mellman A, Karch H (2007c).**  
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a human pathogen in emergence.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **120**, 279-287.

Bielaszewska M, Middendorf B, Köck R, Friedrich A, Fruth A, Karch H, Schmidt A, Mellmann A (2008).

Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in host pathogens evolution.

Clin. Infect. Dis. **45**, 208-217.

Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, Hermoso J, Alonso MP, Dahbi G, González EA, Bernárdez MI, Blanco J (2003a).

Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain.

J. Clin. Microbiol. **41**, 1351-1356.

Blanco M, Blanco JE, Blanco J (2003b).

PCR typing of *eae*, *tir*, *espA* and *esp*. Genes of the pathogenicity island of human and animal attaching and effacing *Escherichia coli*: Identification of three new intimin variant genes; beta 2, mu and nu.

Direct submission.

<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. (2004).

Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999.

J. Clin. Microbiol. **42**, 311-319.

Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J (2004a).

Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (*eae-ξ*).

J. Clin. Microbiol. **42**, 645-651.

Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Maria de Carvalho V, Lopes Onuma D, Pestana de Castro AF (2004b).

Typing of Intimin (*eae*) Genes in Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains from Monkeys.

J. Clin. Microbiol. **42**, 1382-1383.

Blanco M, Schumacher S, Tassara T, Zweifel C, Blanco JE, Dahbi G, Blanco J, Stephan R (2005).

Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-η2*).

BMC Microbiol. **5**, 23-34.

**Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, Madrid C, Juarez A, Bernardez MI, Gonzalez EA, Blanco J (2006a).**  
Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.  
Int. Microbiol. **9**, 103-110.

**Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, Gadea MP, Schelotto F, González EA, Blanco J (2006b).**  
Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel variants ( $\mu$ B and  $\xi$ R/ $\beta$ 2B).  
J. Med. Microbiol. **55**, 1165-1174.

**Blanco M (2008).**  
Nationales Referenzzentrum für *Escherichia coli* (LREC), Lugo, Spanien.  
Persönliche Mitteilung.

**Blank E, Zhong H, Bell A, Whittam T, Donnenberg M (2000).**  
Molecular variation among type IV Pili (*bfpA*) from diverse enteropathogenic *Escherichia coli* strains.  
Infect. Immun. **68**, 7028-7038.

**Blank E, Nougayrère JP, Donnenberg M (2002).**  
Enteropathogenic *Escherichia coli*.  
In: Donnenberg M. *Escherichia coli*-Virulence mechanisms of a versatile pathogen.  
Elsevier Science, San Diego, USA. 81-103.

**Blank E, Lacher D, Scaletsky I, Zhong H, Whittam T, Donnenberg M (2003).**  
Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil.  
Emerg. Infect. Dis. **9**, 113-115.

**Bortolini M, Trabulsi L, Keller R, Frankel G, Sperandio V (1999).**  
Lack of expression of bundle-forming pili in some clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is due to a conserved large deletion in the *bfp* operon.  
FEMS Microbiol. Lett. **179**, 169-174.

**Bray J (1945).**  
Isolation of antigenically homogenous strains of *Bact. Coli neapolitanum* from summer diarrhoeas in infants.  
J. Pathol. Bacteriol. **57**, 239-247.

**Brinkley C, Burland V, Keller R, Rose DJ, Boutin AT, Klink SA, Blattner FR, Kaper JB (2006).**  
Nucleotide sequence analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid pMAR7.  
Infect. Immun. **74**, 5408-5413.

- Bülte M (2001).**  
Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitanten.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **114**, 473-477.
- Bülte M, Göll M (2006).**  
Enteropathogene *E. coli* (EPEC).  
In: Pathogene Mikroorganismen: *Escherichia coli* und Shigellen.  
Behr,s Verlag, Hamburg.
- Busch U, Huber I, Messelhäuser U, Hörmannsdorfer S, Sing A (2007).**  
Nachweis Shigatoxin-bildener/Enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (STEC/EHEC) mittels Real-Time PCR.  
J. Verbr. Lebensm. **2**, 144-148.
- Busch U (2008).**  
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),  
Oberschleißheim.  
Persönliche Mitteilung.
- Campos LC, Franzolin M, Trabulsi LR (2004).**  
Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the tradicional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups - A review.  
Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **99**, 545-552.
- Cantarelli V, Nagayama K, Takahashi A, Honda T, Cauduro P, Dias C, Mezzari T, Brodt T (2000).**  
Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre City, RS, Brazil.  
Braz. J. Microbiol. **31**, 266-270.
- Cantey JR, Blake RK (1977).**  
Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism.  
J. Infect. Dis. **135**, 454-462.
- Carneiro-Sampaio M (2000).**  
Mecanismos de protección mediados por IgA de la leche materna para combatir los tipos de diarrea por *Escherichia coli*.  
Arch. Invest. Pediatr. Méx. **3**, 15-20.
- Carneiro LAM, Lins MC, Garcia FRA, Silva APS, Mauller PM, Alves GB, Rosa CAP, Andrade JRC, Freitas-Almeida AC, Queiroz MLP (2006).**  
Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk.  
Int. J. Food Microbiol. **108**, 15-21.

- Carvalho VM, Gyles CL, Ziebell K, Ribeiro KA, Catão-Dias JL, Sinhorini IL, Otman J, Keller R, Trabulsi LD, Pestana de Castro AF (2003).  
Characterization of monkey Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates.  
J. Clin. Microbiol. **41**, 1225-1234.
- Chen HD, Frankel G (2005).  
Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis.  
FEMS Microbiol. Rev. **29**, 83-98.
- China B, Goffaux F (1999).  
Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*.  
Vet. Res. **30**, 181-202.
- Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH (2002).  
Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: History and clinical aspects.  
Br. J. of Biomed. Sci. **59**, 123-127.
- Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH (2003).  
Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen.  
Clin. Microbiol. Rev. **16**, 365-378.
- Cleary J, Lai L, Shaw R, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg M, Frankel G Knutton S (2004).  
Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin.  
Microbiology. **150**, 527-538.
- Cookson A, Bennett J, Thomson-Carter F, Attwood G (2007).  
Molecular Subtyping and Genetic Analysis of the Enterohemolysin Gene (*ehxA*) from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Atypical Enteropathogenic *E. coli*.  
Appl. Environ. Microbiol. **73**, 6360-6369.
- Cortés C, De la Fuente R, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Dhahi G, Mora A, Justel P, Contreras A, Sánchez A, Corrales JC, Orden JA (2003).  
Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain.  
J. Clin. Microbiol. **41**, 1351-1356.
- Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. (1979).  
An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes.  
Curr. Microbiol. **3**, 95-99.

Da Silva ZN, Da Cunha AS, Lins MC, Carneiro LAM, Almeida AF, Queiroz MLP (2001).

Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil.

Rev. Saúde Pública. **35**, 375-379

Dallal MMS, Khorramizadeh MR, MoezArdalan K (2006).

Ocurrence of enteropathogenic bacteria in children under 5 years with diarrhoea in south Tehran.

La Revue de Santé de la Méditerranée orientale. **12**, 792-797.

Darfeuille-Michaud A, J Boudeau, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie, Colomer J-F (2004).

High Prevalence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's Disease.

Gastroenterology. **127**, 412-421.

Dean-Nystrom E, Bosworth B, Moon H, O'Brien A (1998).

*Escherichia coli* O157 requires intimin for enteropathogenicity in calves.

Infect. Immun. **66**, 4560-4563.

De Buyser M-L, Dufour B, Maire M, Lafarge V (2001).

Implication of milk and milk products in food disease in France and in different industrialized countries.

Int. J. Food Microbiol. **67**, 1-17.

Deibel C, Krämer S, Chakraborty T, Ebel F (1998).

EspE, a novel secreted protein of AE bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 KDa protein.

Mol. Microbiol. **28**, 463-474.

Deng W, Li Y, Vallance B, Finlay B (2001).

Locus of Enterocyte Effacement from *Citrobacter rodentium*: Sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens.

Infect. Immun. **69**, 6323-6335.

Dobrindt U (2005).

(Patho-) Genomics of *Escherichia coli*.

Int. J. Med. Microbiol. **295**, 357-371.

Donnenberg MS, Kaper JB (1991).

Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector.

Infect. Immun. **59**, 4310-4317.

Donnenberg MS, Kaper JB (1992).

Enteropathogenic *Escherichia coli*

Infect. Immun. **60**, 3953-3961.

- Donnenberg MS, Girón JA, Nataro JP, Kaper JB (1992).  
A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence.  
Mol. Microbiol. **6**(22), 3427-3437.
- Donnenberg M, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB (1993a).  
The Role of the eae Gene of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Intimate Attachment In Vitro and in a Porcine Model.  
The Journal of Clinical Investigation. **92**, 1418-1424.
- Donnenberg M, Yu J, Kaper JB (1993b).  
A Second Chromosomal Gene Necessary for Intimate Attachment of Enteropathogenic *Escherichia coli* to Epithelial Cells.  
J. Bacteriol. **175** (15), 4670-4680.
- Donnenberg M, Whittam T (2001).  
Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.  
J. Clin. Invest. **107**, 539-548.
- Donnenberg M (2002).  
Enteropathogenic *Escherichia coli*.  
In: Blaser MJ, Ravdin PD, Greenberg JI, Guerrant RL. Infections of the gastrointestinal tract. Second Edition.  
Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA. 595-612.
- Doyle MP, Padhye V (1989).  
Enteropathogenic *Escherichia coli*.  
In: Doyle MP. Foodborne Bacterial Pathogens.  
Marcel Dekker, New York, USA. 237-241.
- Dulger M, Fabbricotti H, Bando S, Moreira-Fihlo C, Fagundes-Neto U, Scaletsky I (2003).  
Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: Phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* Heat-stable enterotoxin and diarrhea.  
J. Infect. Dis. **188**, 1685-1694.
- Elias WP, Barros S, Moreira C, Trabulsi L, Gomes T (2002).  
Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains among Classical Enteropathogenic *Escherichia coli* O Serogroups.  
J. Clin. Microbiol. **40**, 3540-3541.
- Elliot S, Wainwright LA, McDaniel T, McNamara B, Donnenberg M, Kaper JP (1998).  
The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69.  
Mol. Microbiol. **28**, 1-4.

Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPoct HL, Long KZ (2009).

Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea.

J Clin Microbiol. **47**, 93-8.

Fantasia L, Mestrandrea L, Chrade J, Yager J (1975).

Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese.

Appl. Microbiol. **29**, 179-185.

Feng P, Dey M, Takeda T (2001).

Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes.

Clin. Diag. Labor. Immun. **8**, 711-717.

Fernandes P, Guo Q, Donnenberg M (2007).

Functional consequences of sequence variation in Bundlin, the enteropathogenic *Escherichia coli* Type IV Pilin protein.

Infec. Immun. **75**, 4687-4696.

Food and Drug Administration (FDA) (1992).

<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap14.html>

Frankel G, Candy DCA, Everest P, Dougan G (1994).

Characterization of the C-Terminal Domains of Intimin-Like Proteins of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*.

Infect. Immun. **62**, 1835-1842.

Franzolin MR, Alves RC, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR (2005).

Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **100**, 359-63.

Friedrich AW, Zhang W, Bielaszewska M, Mellmann A, Köck R, Fruth A, Tschäpe H, Karch H (2007).

Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans.

Clin. Infect. Dis. **45**, 39-45.

Fröhlicher E, Zweifel C, Krause G, Beutin L, Stephan R (2007). Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae-positive *E. coli* isolated from pigs and sheep at slaughter.

48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 25-28. September 2007, Garmisch-Partenkirchen.

Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe 25.-28.9.2007, 181, ISSN 0945-3296.

Fruth A (2007).

Nationales Referenz Zentrum für *Escherichia coli* und andere enteritis Erregern. Robert-Koch- Institut. Wernigerode.

Persönliche Mitteilung.

Fruth A (2005).

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

Bioch. Diss. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.

García-Angulo VA, Deng W, Thomas NA, Finlay B, Puente JL (2008).

Regulation of Expression and Secretion of NleH, a New Non-Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Effector in *Citrobacter rodentium*.

J. Bacteriol. **190**, 2388-2399.

Garmendia J, Phillips AD, Carlier MF, Chong Y, Schüller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RK, Knutton S, Frankel G (2004).

TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton.

Cell Microbiol. **6**, 1167-83.

Garmendia J, Frankel G, Crepin V (2005a).

Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections:

Translocation, Translocation, Translocation.

Infect. Immun. **73**, 2573-2585.

Garmendia J, Ren Z, Tennant S, Viera MAM, Chong V, Whale A, Azzopardi K, Dahan S, Sircili MP, Franzolin MR, Trabulsi LR, Phillips A, Gomes T, Xu J, Robins-Browne R, Frankel G (2005b).

Distribution of tccP in Clinical Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates.

J. Clin. Microbiol. **43**, 5715-5720.

Gärtner J, Schmidt A (2004).

Comparative analysis of Locus of Enterocyte Effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.

Infect. Immun. **72**, 6722-6728.

Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK (1991).

An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*.

Science. **254**, 710-713.

- Girón JA, Donnenberg MS, Martin WC, Jarvis KG, Kaper JB (1993).**  
Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*.  
J. Infect. Dis. **168**, 1037-1041.
- Gomes TAT, Irino K, Girao VBC, Guth BEC, Vaz TMI, Moreira FC, Chinarelli SH, Vieira MAM (2004).**  
Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains?  
Emerg. Infect. Dis. **10**, 1851-1855.
- Gómez-Duarte OG, Kaper JB (1995).**  
A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*.  
Infect. Imm. **63**, 1767-1776.
- Gonzalez AGM, Rosa ACP, Andrade JRC, Tibana A (2000).**  
Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil.  
Food Microbiol. **17**, 321-328.
- Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW (1995).**  
Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene.  
J. Clin. Microbiol. **33**, 1375-1377.
- Hedberg CW, Savarino SJ, Besser JM, Paulus CJ, Thelen LJ, Myers LJ, Cameron DN, Barrett TJ, Kaper JB, Osterholm MT (1997).**  
An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*.  
J. Infect. Dis. **176**, 1625-1628.
- Hernandes RT, Silva R, Carneiro SM, Salvador FA, Fernandes M, Padovan ACB, Yamamoto D, Mortana RA, Elias WP, Briones AR, Gomes TAT (2008).**  
The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion.  
Cell. Microbiol. **10**, 415-425.
- Hicks S, Frankel G, Kaper JB, Dougan G, Phillips AD (1998).**  
Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro.  
Infect. Immun. **66**, 1570-1578
- Hien BT, Scheutz F, Cam PD, Serichantalergs, Huong TT, Thu TM, Dalsgaard A (2008).**  
Diarrheogenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam.  
J. Clin. Microbiol. **46**, 996-1004.

- Hill SM, Phillips AD, Walker-Smith JA (1991).  
Enteropathogenic *Escherichia coli* and life threatening chronic diarrhoea.  
Gut. **32**, 145-158.
- Holko I, Bisova T, Holkova Z, Kmet V (2006).  
Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses  
made from unpasteurised sheep milk in Slovakia.  
Food Control. **17**, 393-396.
- Hornitzky MA, Mercieca K, Bettelheim KA, Djordjevic SP (2005).  
Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of  
serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga  
Toxin-Producing *E. coli* strains that commonly possess intimin.  
Appl. Environ. Microbiol. **71**, 3405-3412.
- Huber I (2006).  
Optimierung der PCR.  
5. PCR-Workshop des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und  
Lebensmittelsicherheit und der Akademie für Gesundheit, Ernährung und  
Verbraucherschutz. 22.-23. November 2006. Oberschleißheim. Deutschland.
- Hunter P (2003).  
Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*.  
Journal of Water and Health. 01.2, 65-72.
- Hwang J, Bieber D, Ramer S, Wu C-Y, Schoolnik G (2003).  
Structural and topographical studies of the type IV Bundle-forming Pilus  
assembly complex of enteropathogenic *Escherichia coli*.  
J. Bacteriol. **185**, 6695-6701.
- Iida M, Yamazaki M, Yatsuyanagi J, Ratchtrachenchai O-A, Subpasu S,  
Okamura N, Ito K (2006).  
Typing of *bfpA* genes of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates in Thailand  
and Japan by Heteroduplex Mobility Assay.  
Microbiol. Immun. **50**, 713-717.
- Ishii S, Meyer KP, Sadowsky MJ (2007).  
Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence  
Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse Human and Animal  
Sources.  
Appl. Environ. Microbiol. **73**, 5703-5710.
- Jarafi F, Shokrzadeh L, Hamidian M, Salmanzadeh-Ahrabi S, Zali M (2008a).  
Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in  
Tehran.  
Jpn. J. Infect. Dis. **61**, 269-273.

Jarafi F, Garcia-Gil L, Salmanzadeh-Ahrabi L, S Shokrzadeh, Aslani M, Pourhoseingholi M, Derakhshan F, Zali M (2008b).

Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals.

J. Infect. **58**, 21-27.

Jenkins C, Lawson AJ, Cheasty T, Willshaw GA, Wright P, Dougan G, Frankel, Smith HR (2003).

Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Ireland.

Mol. Cell. Prob. **17**, 149-156.

Jenkins C, Smith HR, Lawson AJ, Willshaw GA, Cheasty T, Wheeler JG, Tompkins DS (2006).

Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **25**, 19-24.

Jensen C, Ethelberg S, Olesen B, Schiellerup P, Olsen KEP, Scheutz F, Nielsen EM, Neimann J, Høgh B, Gerner-Smidt P, Mølbak K, Krogfelt KA (2007).

Attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from Danish children: clinical significance and microbiological characteristics.

Clin. Microbiol. Infect. **13**, 863-872.

Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB (1990).

A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**(20), 7839-7843.

Jerse AE, Gicquelais KG, Kaper JB. (1991).

Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*.

Infect. Immun. **59**(11), 3869-3875.

Jerse AE, Kaper JB (1991).

The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid.

Infect. Immun. **59**(12), 4302-4309.

Jores J, Zehmke K, Eichberg J, Rumer L, and Wieler LH (2003).

Description of a Novel Intimin Variant (Type-ζ) in the Bovine O84:NM Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Strain 537/89 and the Diagnostic Value of Intimin Typing.

Exp. Biol. Med. **228**, 370-376.

Jürgens D, Özel M, Takaisi-Kikuni NB (2002).

Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes.

Cell Biol. Int. **26**, 175-186.

- Kagli DM, Vancanneyt M, Vandamme P, Hill C, Cogan TM (2007).**  
Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces.  
J. Appl. Microbiol. **103**, 1393-1405.
- Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M (2005).**  
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine.  
Int. J. Med. Microbiol. **295**, 405-418.
- Kaper JB (1996).**  
Defining EPEC.  
Rev. Microbiol. **27**, 130-133.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley LT (2004).**  
Pathogenic *Escherichia coli*.  
Nat. Rev. **2**, 123-140.
- Kauffmann M, Zweifel C, Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Beutin L, Stephan R (2006).**  
*Escherichia coli* O157 and non- O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland.  
J. Food Prot. **69**, 260-266.
- Kelly G, Prasannan S, Daniell S, Fleming K, Frankel G, Dougan G, Connerton I, Matthews S (1999).**  
Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*.  
Nat. Struct. Biol. **6**, 313-318.
- Kenny B, Abe A, Stein M, Finlay B (1997a).**  
Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract.  
Infect. Immun. **65**, 2606-2612.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay B (1997b).**  
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells.  
Cell. **91**, 511-20.
- Keskimäki M, Saari M, Heiskanen T, Siitonen A (1998).**  
Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: Prevalence and Characteristics of Isolates.  
J. Clin. Microbiol. **36**, 3641-3646.
- Keskimäki M, Eklund M, Pesonen H, Heiskanen T, Siitonen A (2001).**  
EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates.  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **40**, 151-156.

**Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, López C, González EA, Blanco J (2006).**

Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia.

BMC Vet. Research. **2**, 10-18.

**Kimiko K, Tooru Y, Toshitaka Y (2001).**

Detection of diarrhea-associated *Escherichia coli* from river water in Miyazaki Prefecture.

Annual Report of the Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment. **12**, 67-70.

**Kirsch P, Jores J, Wieler L (2004).**

Plastizität bakterieller Genome: Pathogenitätsinseln und der Locus of Enterocyte Effacement (LEE).

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **117**, 116-129.

**Klapproth JM, Scaletsky IC, McNamara BP, Lai LC, Malstrom C, James SP; Sonnenberg MS (2000).**

A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* that inhibits lymphocyte activation.

Infect. Immun. **68**, 2148-2155.

**Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS (1989).**

Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

Infect. Immun. **57**, 1290-1298.

**Kothary M, Babu U (2001).**

Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review.

J. Food. Sci. **21**, 49-73.

**Kozub-Witkowski, E., G. Krause, G. Frankel, D. Kramer, B. Appel, L. Beutin (2007).**

Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany.

J. Appl. Microbiol. **21**, 1788-1789.

**Krause G, Zimmermann S, Beutin L (2005).**

Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types.

Vet. Microbiol. **106**, 87-95.

**Lan R, Lumb B, Ryan D, Reeves PR (2001).**

Molecular Evolution of Large Virulence Plasmid in *Shigella* Clones and Enteroinvasive *Escherichia coli*.

Infect. Immun. **69**, 6303-6309.

Leomil L, Pestana de Castro A, Krause G, Schmidt H, Beutin L (2005).  
Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species.  
FEMS Microbiol. Lett. **249**, 335-342.

Levine MM, Edelman R (1984).  
Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis.  
Epidemiol. Rev. **6**, 31-51.

Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clemets ML, O'Brien AD (1985).  
The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor.  
J. Infect. Dis. **152**, 550-559.

Li M, Rosenshine I, Yu HB, Nadler C, Mills E, Hew C, Leung K (2006).  
Identification and characterization of NleI, a new non-LEE-encoded effector of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC).  
Microb. Infect. **8**, 2890-2898.

Magalhaes C, Rossato S, Barbosa A, Batista I, Piazza R (2008).  
Enterohemolysin of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates: new phenotypic and functional features.  
Pathogenic *E. coli* Network (PEN)-International Conference: „*E.coli*: Pathogenicity, Virulence and emergency pathogenic strains”.  
Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italien, 6-7 March 2008, 20.

Malik A, Istvan T, Beutin L, Schmidt H, Taminiau B, Dow MA, Morabito S, Oswald E, Mainil J, Nagy B (2006).  
Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*<sup>+</sup> *Escherichia coli* from weaned pigs.  
Vet. Microbiol. **114**, 82–93.

Marchès O, Covarelli V, Dahan S, Cougoule C, Bhatta P, Frankel G, Caron E (2008).  
EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsonophagocytosis.  
Cell. Microbiol. **10**, 1104-1115.

Martins de Melo KC, Ruiz R (2008).  
Anti-phagocytic mechanisms in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC).  
Pathogenic *E. coli* Network (PEN)-International Conference: „*E.coli*: Pathogenicity, Virulence and emergency pathogenic strains”.  
Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italien, 6-7 March 2008, 57.

- McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB (1995).**  
A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **92**, 1664-1668.
- McGraw EA, Li J, Selander RK, Whittam TS (1999).**  
Molecular evolution and mosaic structure of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  intimins of pathogenic *Escherichia coli*.  
Mol. Evol. Biol. **16**, 12–22.
- Mellies JL, Barron AMS, Carmona AM (2007).**  
Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation.  
Infect Imm. **75**, 4199-4210.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Zimmerkackl L, Prager R, Harmsen D, Tschäpe H, Karch H (2005).**  
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: In vivo evolution of a bacterial pathogen.  
Clin. Infect. Dis. **41**, 785-792.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Köck R, Friedrich A, Fruth A, Middendorf B, Harmsen D, Schmidt A, Karch H (2008).**  
Analysis of collection of Hemolytic Uremic Syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*.  
EID. **14**, 1287-1290.
- Ménard LP, Lussier JG, Lépine F, Paiva de Sousa C, Dubreuil JD (2004).**  
Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1.  
Protein Expression and Purification. **33**, 2223-2231.
- Messelhäußer U, Schreiner H, Schulze G, Sing A, Busch U (2007).**  
Nachweis von STEC/EHEC in Fleisch und Fleisचेerzeugnissen sowie in Umgebungsproben.  
Fleischwirtschaft. **11**, 115-118.
- Milon A, Oswald E, De Rycke J (1999).**  
Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*.  
Vet. Res. **30**, 203-219.
- Moon HW, Whipp ISC, Argenzio RA, Levine AA, Giannella RA (1983).**  
Attaching and Effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines.  
Infect. immun. **41**, 1340-1351.

**Mora A, León S, Blanco M, Blanco JE, López C, Dahbi G, Echeita A, González E, Blanco J (2007).**

Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru).

Int. J. Food Microbiol. **114**, 204-210.

**Mora A, Blanco M, Jesús E Blanco, Dahbi G, López C, Justel P, Alonso MP, Echeita A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J (2007).**

Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003.

BMC Microbiol. **7**, 13-22.

**Morato EP, Leomil L, Beutin L, Krause G, Moura RA, Pestana de Castro AF (2008).**

Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types.

Zoonoses Public Health. Epub Ahead of print.

**Moyenuddin M, Wachsmuth K, Moseley S, Bopp C, Blake P (1989).**

Serotype, antimicrobial resistance, and adherence properties of *Escherichia coli* strains associated with outbreaks of diarrheal illness in children in the United States.

J. Clin. Microbiol. **27**, 2234-2239.

**Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H (2007)**

Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania.

BMC Infect. Dis. **7**, 92-99.

**Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt MA (2007).**

Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR.

Appl. Environ. Microbiol. **73**, 3380-3390.

**Mundy R, Schüller S, Girard F, Fairbrother JM, Phillips AD, Frankel G (2007).**

Functional studies of intimin *in vivo* and *ex vivo*: implications for host specificity and tissue tropism.

Microbiology **153**, 959-967.

**Najand LM, Ghanbarpour R (2006).**

A study on enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from domestic Iranian soft cheese.

Veterinarski Archiv. **76**, 531-536.

Nataro JP, Scaletsky ICA, Kaper JB, Levine M, Trabulsi L (1985).  
Plasmid-Mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*.  
Infect. Immun. **48**, 378-383.

Nataro JP, Kaper JB (1998).  
Diarrheagenic *Escherichia coli*.  
Clin. Microbiol. Rev. **11**, 142-201.

Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL (1998).  
Enteroregative *Escherichia coli*.  
Emerg. Infect. Dis. **4**, 251-261.

NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI (BLAST)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Nguyen TV, Van PL, Huy CL, Gia KN, Weintraub A (2005).  
Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam.  
J. Clin. Microbiol. **43**, 755-760.

Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Kitase T, Abe N, Nakamura H, Wada T, Ishii E, Haruki K (2002).  
Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*.  
Jpn. J. Infect. Dis. **55**, 183-90.

Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM (2006).  
Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children.  
Emerg. Infect. Dis. **12**, 597-603.

N. N.

Verordnung über die Qualität von Wasser für die menschlichen Gebrauch.  
Trinkwasserverordnung - TrinVW 2001.

Norazah A, Rahizan I, Zainuldin T, Rohani MY, Kamel AG (1998).  
Enteropathogenic *Escherichia coli* in raw and cooked food.  
Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. **29**, 91-3.

Nyatoti VN, Mtero SS, Rukure G (1997).  
Pathogenic *Escherichia coli* in traditional African weaning foods.  
Food Control. **8**, 51-54.

- Nunes EB, Saridakis HO, Irino K, Pelayo JS (2003).**  
Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil.  
J. Med. Microbiol. **52**, 499-504.
- Obi CL, Green E, Bessong PO, de Villiers B, Hoosen AA, Igumbor EO, Potgieter N (2004).**  
Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa.  
Water SA. **30**, 37-42.
- Ochoa T, Barletta F, Contreras C, Mercado E (2008).**  
New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **102**, 852-856.
- Okeke IN, Lamikanra A, Steinrück H, Kaper J (2000).**  
Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial Southwestern Nigeria.  
J. Clin. Microbiol. **38**, 7-12.
- Olesen B, Neimann J, Böttiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C, Helms M, Scheutz F, Olsen K, Krogfelt K, Petersen E, Mølbak K, Gerner-Smidt P (2005).**  
Etiology of Diarrhea in Young Children in Denmark: a Case-Control Study.  
J. Clin. Microbiol. **43**, 3636-3641.
- Orden JA, Cortés C, Horcajo P, De la Fuente R, Blanco JE, Mora A, López C, Blanco J, Contreras A, Sánchez A, Corrales JC, Domínguez-Bernal G (2007).**  
A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds.  
Vet. Microbiol. **132**, 428-434.
- Ørskov F, Ørskov I (1984).**  
Serotyping of *Escherichia coli*.  
Methods in Microbiology. **14**, 43-112.
- Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A (2000).**  
Typing of Intimin Genes in Human and Animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a New Intimin Variant.  
Infect. Immun. **68**, 64-71.
- Paciorek J (2002).**  
Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serpgroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea.  
J. Med. Microbiol. **51**, 548-556.

- Paiva de Sousa C, Dubreuil JD (2001).**  
Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*.  
Int. J. Med. Microbiol. **291**, 15-20.
- Pan J (2002).**  
A new *eae*-lambda gene and a IS200 variant inserting in intergenic region between *eae* and *escD*.  
Direct submission.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=16930738>
- Pandey M, Khan A, Das S, Sarkar B, Kahali S, Chakraborty S, Chattopadhyay S, Yamasaki S, Takeda Y, Nair B, Ramamurthy T (2003).**  
Association of Cytolethal Distending Toxin Locus *cdtB* with Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Diarrhea in Calcutta, India.  
J. Clin. Microbiol. **41**, 5277-5281.
- Pelayo JS, Scaletsky IC, Pedroso MZ, Sperandio V, Giron JA, Frankel G, Trabulsi LR (1999).**  
Virulence properties of atypical EPEC strains.  
J. Med. Microbiol. **48**, 41-49.
- Penteado AS, Ugrinovich LA, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Morab A, Andrade JRC, Corre SS, Pestana de Castro AF (2002).**  
Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil.  
Vet. Microbiol. **89**, 41-51.
- Phillips AD, Frankel G (2000).**  
Intimin-Mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human organ cultures.  
J. Infect. Dis. **181**, 1496-500.
- Pradel N, Bertin Y, Martin C, Livrelli V (2008).**  
Molecular analysis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients in France.  
Appl. Environ. Microbiol. **74**, 2118-2128.
- Prager R, Liesegang A, Voigt W, Rabsch W, Fruth A, Tschäpe H (2002).**  
Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H- in Germany.  
Infect. Genet. Evol. **1**, 265-275.
- Prager R, Strutz U, Fruth A, Tschape (2003).**  
Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains with flagellar H antigens: serotyping versus *fliC* polymorphisms.  
Int. J. Med. Microbiol. **292**, 477-480.

- Prère MF, Bacrie SC, Baron O, Fayet O (2006).  
Bacterial aetiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups.  
Pathol. Biol. **54**, 600-602.
- Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque ASG, Sack RB (2005).  
Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment and Prevention.  
Clin. Microbiol. Rev. **18**, 465-483.
- Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Downton M, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP (2003).  
Distribution of Intimin Subtypes among *Escherichia coli* Isolates from Ruminant and Human Sources.  
J. Clin. Microbiol. **41**, 5022-5032.
- Ramteke PW, Tewari S (2007).  
Serogroups of *Escherichia coli* from Drinking Water.  
Environmental Monitoring and Assessment. **130**, 215-220.
- Ratchtranchenchai OA, Subpasu S, Hayashi H, Ba-Thein W (2004).  
Prevalence of childhood diarrhea-associated *Escherichia coli* in Thailand.  
J. Med. Microbiol. **53**, 237-247.
- Reid S, Betting D, Whittam T (1999).  
Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR.  
J. Clin. Microbiol. **37**, 2719-2722.
- Reischl U, Youssef MT, Kilwinski J, Lehn N, Zhang WL, Karch H, Strockbine NA (2002).  
Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*.  
J. Clin. Microbiol. **40**, 2555-2565.
- Regua-Mangia AH, Andrade JR, Gonzadez AGM, Zahner V, Cerqueira AMF, Teixeira LM (2008).  
Genetic relatedness of a non-motile variant O157 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains belonging to pathogenic related groups.  
Microbiol. Research. **163**, 225-233.
- Robins-Browne RM, Hartland EL (2002).  
*Escherichia coli* as a cause of diarrhea  
J. Gastr. Hepat. **17**, 467-475.

Robins-Browne RM, Bordun A-M, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, Lister NA, Bettelheim KA, Fairley CK, Sinclair MI, Hellard ME (2004).

*Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1797-1805.

Rodrigues J, Scaletsky I, Campos L, Gomes T, Whittam T, Trabulsi L (1996). Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55.

*Infect. Immun.* **64**, 2680-2686.

Roggentin P, Kolb N, Bockemühl J (2005).

Influence of brewing temperature and brewing period on the microbial kinetics in herbal infusions.

*Archiv für Lebensmittelhygiene.* **56**, 97-120.

Rosenshine I, Ruschkowski S, Finlay B (1996).

Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature and protein synthesis upon contact with epithelial cells.

*Infect. Immun.* 966-973.

Roth C (2004).

Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in der Umwelt sowie zum Vorkommen in Kotproben von Wasservögeln.

Diss. Med. Technische Universität, München.

Russo TA, Johnson JR (2000).

Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC.

*J. Infect. Dis.* **181**, 1753-1764.

Saito N, Kawano M, Kobayashi T, Watanabe S, Yamada W, Yatsu J, Kawamukai K, Akiyama K (2005).

An outbreak of food poisoning caused by an enteropathogenic *Escherichia coli* O115:H19 in Miyagi prefecture.

*Jpn. J. Infect. Dis.* **58**, 189-190.

Sainz T, Wachter C, Espinoza J, Centurión D, Navarro A, Molina J, Inzunza A, Cravioto A, Eslava C (2001).

Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food.

*Int. J. Food Microbiol.* **71**, 169-176.

Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM (1991).

Enteraggagative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in a *in vitro* rabbit intestinal model.

*J. Clin. Invest.* **87**, 1240-1255.

**Savarino SJ, Mc Veigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A (1996).**

Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stabile enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*.

J. Infect. Dis. **173**, 1019-1022.

**Scaletsky ICA, Silva MLM, Trabulsi LR (1984).**

Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells.

Infect. Immun. **45**, 534-536.

**Scaletsky ICA, Pedroso MZ, Oliva CAG, Carvalho RLB, Morais MB, Fagundes-Netto U (1999).**

A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea.

Infect. Immun. **67**. 3410-3415.

**Scaletsky ICA, Michalski J, TorresAG, Dulguer MV, Kaper JB (2005).**

Identification and Characterization of the Locus for Diffuse Adherence, Which Encodes a Novel Afimbrial Adhesin Found in Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*.

Infect. Immun. **67**, 3410-3415.

**Schauer DB, Falkow S (1993a).**

Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype 4280 that causes transmissible murine colonic hyperplasia.

Infect. Immun. **61**, 2486-2492.

**Schauer DB, Falkow S (1993b).**

The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia.

Infect. Immun. **61**, 4654-4661.

**Scheutz F, Strockbine NA (2005).**

Genus *Escherichia*.

In: Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Second Edition.

Springer, New York, USA. 607-613.

**Schindler PRG, Elmer-Englhard D, Huber H Ch (2003).**

Überwachung der Badegewässer in Südbayern unter Berücksichtigung aktueller Krankheitserreger.

Münchn. Betr. Abw-, Fisch.- u. Flußbiol. **55**, 41-60.

**Schindler PRG (2004).**

Fäkale Verunreinigungen im Trinkwasser. Wasser - Reservoir des Lebens. Aktuelle Fragen zu Wasserversorgung und -hygiene.

Seminarband FLUSS/GSF-Bericht 01, 17-26.

- Schmidt H, Russmann H, Karch H (1993).**  
Virulence determinants in nontoxigenic *Escherichia coli* O157 strains that cause infantile diarrhea.  
Infect. Immun. **61**, 4894-4898.
- Schmidt H, Beutin L, Karch H (1995a).**  
Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933.  
Infect. Immun. **63**, 1055-1061.
- Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H (1995b).**  
Development of PCR for Screening of Enteroaggregative *Escherichia coli*.  
J. Clin. Microbiol. **33**, 701-705.
- Schmidt H, Hensel M (2004).**  
Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis.  
Clin. Microbiol. Rev. **17**, 14-56.
- Scheiber C (2008).**  
Genotypische und phänotypische Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden und enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-Isolaten von Mensch, Tier, Lebensmittel und Wasser aus Bayern in Zeitraum von 2002 bis 2006.  
Diss. Vet. Med., Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Scott DA, Kaper JB (1994).**  
Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin.  
Infect. Immun. **62**, 244-251.
- Servin A (2005).**  
Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*.  
Clin. Microbiol. Rev. **18**, 264-292.
- Silva ZN, Cunha AS, Lins MC, Carneiro L, Almeida A, Queiroz M (2001).**  
Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil.  
Rev. Saude Publica. **35**, 375-379.
- Smith H, Willshaw G, Cheasty T (2004).**  
*E. coli* as a cause of outbreaks of diarrhoeal disease in the UK.  
Microbiol. Today. **31**, 117-118.
- Sperandio V, Kaper J, Bortolini M, Neves B, Keller R, Trabulsi L (1998).**  
Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes.  
FEMS Microbiol. Lett. **164**, 133-139.

Stakenborg T, Vandekerchove D, Mariën J, Laevens H, Imberechts H, Peeters J (2006).

Protection of rabbits against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) using an intimin null mutant.

BMC Vet Res. **2**, 22-32.

Stephan R, Borel N, Zweifel C, Blanco M, Blanco JE (2004).

First isolation and further characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O157:H45 strains from cattle.

BMC Microbiol. **4**, 10-16.

Tarr CL, Whittam TS (2002).

Molecular Evolution of the Intimin Gene in O111 Clones of Pathogenic *Escherichia coli*.

J Bacteriol. **184**, 479-487.

Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, Swaminathan B (1995).

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Puls-Field Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing.

J. Clin. Microbiol. **33**, 2233-2239.

Tobe T, Hayashi T, Han CG, Schoolnik GK, Ohtsubo E, Sasakawa C (1999).

Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid.

Infect. Immun. **67**, 5455-5462.

Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'Acqua L, Gaione P, Méndez MV, Ferrari AM, Montano A, Zanetta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E (2001).

Etiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates.

J. Clin. Microbiol. **39**, 2134-2139.

Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA (2002).

Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.

Emerg. Infect. Dis. **8**, 508-513.

Tzipori S, Gibson R, Montanaro J (1989).

Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors.

Infect. Immun. **57**, 1142-1150.

Vallance BA, Finlay BB (2000).

Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **97**, 8799-8806.

Varela G, Jasinski C, Gadea C, Maria NM, Mota MI, Arenas C, Pardo L, Gonzalez S, Gonzalez G, Sirok A, Schelotto F (2007).

*Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rosell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas.

Rev. Med. Urug. **23**, 153-163.

Vaz TM, Irino K, Nishimura L, Cergole-Novella MC, Guth BE (2006).

Genetic heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

J. Clin. Microbiol. **44**, 798-804.

Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos SR, Frankel G, Gomes TA (2001).

Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences.

J. Infect. Dis. **183**, 762-772.

Wani SA, Hussain I, Fayaz I, Mir MA, Nishikawa Y (2008).

Subtype analysis of stx1, stx2 and eae genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India.

Vet J. Article in Press.

Wenzel AN, Lejeune JT (2007).

Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources.

Letters in Appl. Microbiol. **45**, 504-507.

World Health Organisation (WHO, 1987).

Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. Manual for laboratory investigation of acute enteric infections.

Geneva, 1987.

World Health Organisation (WHO, 1996).

Guidelines for drinking-water quality. 2nd Edition.

In: Microbial indicators of water quality. Kap 9, 84-85.

Wolf MK (1997).

Ocurrence, Distribution and associations of O and H Serogroups colonization factor antigens and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*.

Clin. Microbiol. Rev. **10**, 569-584.

Wu S-X, Peng R-Q (2008).

Studies on an outbreak of neonatal diarrhea caused by EPEC 0127:H6 with plasmid analysis restriction analysis and outer membrane protein determination.

Acta Pædiatrica. **81**, 217-221.

- Yamamoto T, Nakazawa M (1997).  
Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E.coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea.  
J. Clin. Microbiol. **35**, 223-227.
- Yang J, Wu F, Tsai J, Mu J, Lin L, Chen K, Kuo S, Chiang C, Wu H (2007).  
Comparison between O Serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan.  
J. Clin. Microbiol. **45**, 3620-3625.
- Yatsuyanagi J, Saito S, Sato H, Miyajima Y, Amano K, Enomoto K (2002).  
Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks.  
J. Clin. Microbiol. **40**, 294-297.
- Yatsuyanagi J, Saito S, Miyajima Y, Amano K-I, Enomoto K (2003).  
Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan.  
J. Clin. Microbiol. **41**, 2033-2039.
- Yu J, Kaper JB (1992).  
Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7.  
Mol. Microbiol. **6**, 411-417.
- Yuste M, De la Fuente R, Ruiz-Santa-Quinteria JA, Cid D, Orden JA (2006).  
Detection of the *astA* (EAST1) gene in attaching and effacing *Escherichia coli* from ruminants.  
J. Vet. Med. **53**, 75-77.
- Zajacová Z, Hamrik J, Konstanvinová L, Alexa P (2008).  
The presence of *astA* gene among the strains isolated from pigs without diarrhea.  
Pathogenic E. coli Network (PEN)-International Conference: „*E.coli*: Pathogenicity, Virulence and emergency pathogenic strains”. Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, 6-7 March 2008, 41.
- Zamboni A, Fabbrocetti H, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA (2004).  
Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors Are Found To Be Associated with Infantile Diarrhea in Brazil.  
J. Clin. Microbiol. **42**, 1058-1063.
- Zhang WL, Köhler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H (2002).  
Genetic Diversity of Intimin Genes of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains.  
J. Clin. Microbiol. **40**, 4486-4492.

Zhou Z, Ogasawara J, Nishikawa Y, Helander A, Hase A, Iritani N, Nakamura H, Kai A, Kamata Y, Hoshi H, Haruki K (2002).  
An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 (EAST1).  
Epidemiol. Infect. **128**, 363-371.

Zweifel C, Stephan R (2005).  
Wiederkäuer sind Reservoirs für STEC: Ein Problem?  
BVET-Magazin **3**, 6-7.

## Veröffentlichungen

García Díez M, Westermann, Wolf S, Meindl K, Schalch B, Busch U (2007).  
Prävalenz von Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) in Lebensmitteln.  
2. EHEC-Workshop der Akademien für Gesundheit, Ernährung und  
Verbraucherschutz in Zusammenarbeit mit den Fachgruppen „Gastrointestinale  
Infektionen“ und „Lebensmittelmikrobiologie und – hygiene“ der Deutschen  
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und „Bakteriologie und Mykologie“  
der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 9-11 Mai 2007. Wildbad  
Kreuth.  
Proceed. 64, ISBN 978-3-939652-25-0.

Westerman J, García Díez M, Wolf S, Meindl K, Schalch B, Busch U (2007).  
Untersuchung von humanen Stuhlproben und Lebensmittelproben auf  
verschiedene Pathovare (EHEC, ETEC, EIEC) von *Escherichia coli* im Jahr  
2005 in Bayern  
2. EHEC-Workshop der Akademien für Gesundheit, Ernährung und  
Verbraucherschutz in Zusammenarbeit mit den Fachgruppen „Gastrointestinale  
Infektionen“ und „Lebensmittelmikrobiologie und - hygiene“ der Deutschen  
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie und „Bakteriologie und Mykologie“  
der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 9-11 Mai 2007. Wildbad  
Kreuth.  
Proceed. 67, ISBN 978-3-939652-25-0.

Busch U, Schreiber C, García Díez M, Huber I, Hörmansdorfer S, Sing A  
(2007).  
Molecular subdifferentiation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from  
Bavaria, 2006.  
59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie  
(DGHM), 30. September-4. Oktober 2007, Göttingen.  
Int. J. Med. Microbiol. 297S1, 52.

García Díez M, Westermann J, Wolf S, Meindl K, Schalch B, Sing A, Busch U  
(2007).  
Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) - Vorkommen in Lebensmitteln  
48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen  
Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 25.-28. September 2007,  
Garmisch-Partenkirchen.  
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe 25.-  
28.9.2007, 181, ISSN 0945-3296.

García Díez M, Schreiber C, Schalch B, Busch U (2008a).  
Enteropathogenic *Escherichia coli*: Comparison between isolates of human and  
food origin.  
Pathogenic E. coli Network (PEN)-International Conference: „*E.coli*:  
Pathogenicity, Virulence and emergency pathogenic strains“. Istituto Superiore  
di Sanità, Rome, Italy, 6-7 March 2008, 61.

Schreiber C, García Díez M, Schalch B, Sing A, Busch U (2008).  
Molecular characterization of STEC/EHEC-isolates of human, animal, food and water origin.

Pathogenic *E. coli* Network (PEN)-International Conference: „*E. coli*: Pathogenicity, Virulence and emergency pathogenic strains“. Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italien, 6-7 März 2008, 50.

García Díez M, Wolf S, Meindl K, Fräßdorf J, Messelhäuser U, Schalch B, Busch U (2008b).

Enteropathogene *Escherichia coli*: Charakterisierung von Isolaten aus Lebensmitteln und Wasser

10. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) in Zusammenarbeit mit der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 9.-11. April. 2008, Hohenheim.

García Díez M, Schalch B, Messelhäuser U, Busch U (2008c).

Prävalenz von enteropathogene *Escherichia coli* bei Lebensmitteln und Wasser in Bayern in 2007.

49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), 29. 9- 2. 10. 2008, Garmisch-Partenkirchen.

Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe, 47, ISSN 0945-3296.

García Díez M, Meindl K, Fräßdorf J, Wolf S, Schalch B, Busch U (2009a).

Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in food and water in Bavaria in 2007.

Archiv für Lebensmittelhygiene März/April 2009, 77-81.

García Díez M, Schalch B, Busch U (2009b).

Vorkommen und Charakterisierung von enteropathogenen *Escherichia coli*-Stämmen aus Lebensmitteln, Wasser und humanen Ursprungs.

11. Fachsymposium der VAAM-Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie, 22.-24. Juni 2009, Wildbad Kreuth.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Barbara Schalch und Herrn Dr. Ulrich Busch für die freundliche und engagierte Betreuung bei der Anfertigung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Jasmin Fräßdorf, Katja Meindl, Sabine Wolf sowie Heidi Söller, Henrike Skala und Dr. Melanie Pavlovich für die freundliche und geduldige Einarbeitung in das Fachgebiet und die nicht nur fachlich sondern auch persönliche Unterstützung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit. Frau Dr. Ute Messelhäuser gilt mein Dank für die bereitwillige Beantwortung aller Fachfragen, für ihre Hilfsbereitschaft und für das Korrekturlesen.

Des Weiteren danke ich meiner Promotionskollegin Frau Dr. Carolin Schreiber für ihre Unterstützung sowie für ihre wertvollen Korrekturvorschläge sowie Frau Dr. Ingrid Huber und Frau Dr. Regina Schuegger.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Herbert Schmidt, Universität Hohenheim, der freundlicherweise die Kontrolle für die Intiminsubtypisierung zu Verfügung gestellt hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Jorge Blanco und Dr. Azucena Mora sowie bei Ghizlane Dahbi und Cecilia López aus dem spanischen Referenzzentrum für *Escherichia coli* in Lugo, Galizien (Spanien) für die freundliche und großzügige Aufnahme in ihrem Labor.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern und Roberto für die liebevolle sowie verständnisvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.