

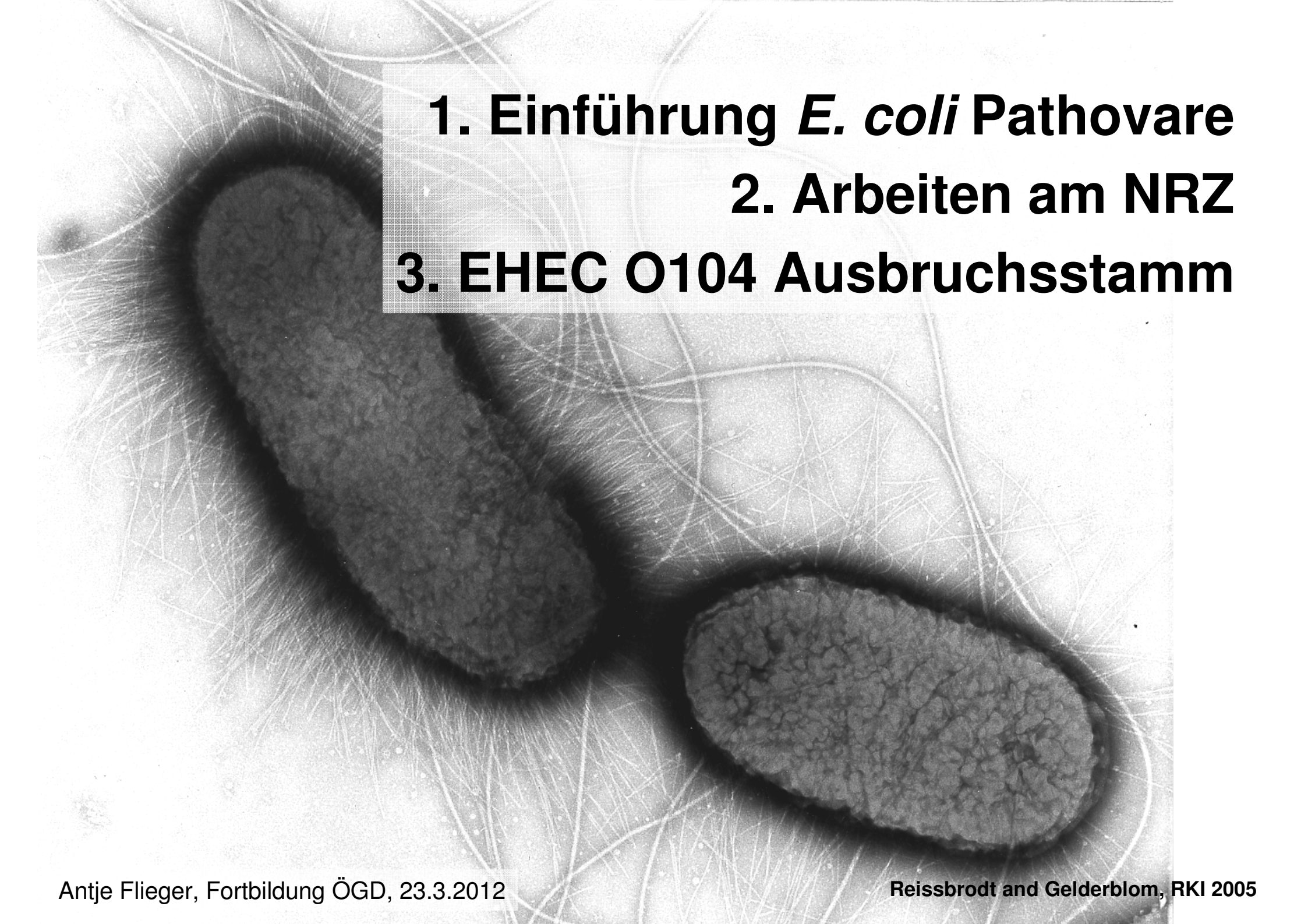
Ein bisschen von hier und ein bisschen von da - Mikrobiologische Aspekte des EHEC O104:H4 Ausbruchsstammes

Antje Flieger

**Robert Koch-Institut
Wernigerode**

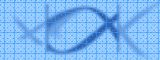
Fortbildung für den ÖGD, 23.3.2012

Reissbrodt und Gelderblom, RKI 2005

- 
- A black and white electron micrograph showing several rod-shaped E. coli bacteria. The bacteria are covered in fine, hair-like pili. One bacterium is in the foreground, showing its detailed surface texture. Another is partially visible behind it, and a third is further back. The background is a light, fibrous network.
- 1. Einführung *E. coli* Pathovare**
 - 2. Arbeiten am NRZ**
 - 3. EHEC O104 Ausbruchsstamm**



1. Einführung *E. coli* Pathovare



- RKI Fachgebiet Bakterielle Infektionen FG11
- NRZ für Salmonellen und andere Bakterielle Enteritiserreger
- Ausbruchsuntersuchungen, Detektion von Pathogenveränderungen
- ***Salmonella*, intestinal pathogene *E. coli*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes***
- Subtypisierung 6.000 Stämme / Jahr
- 1-2.000 intestinal pathogene *E. coli*
- Stammsammlung ~ 180.000 Isolate, incl. 20.000 *E. coli*

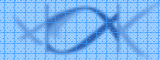


1. Einführung *E. coli* Pathovare



- Generelle Aspekte von *E. coli*
- Gramnegativ, peritriche Flagellen, Fimbrien / Pili
- Bestandteil **Normalflora** des Darmes
- **humanpathogene *E. coli***
- **Pathovare (EHEC: HUS O157, EAEC, EPEC, EIEC)**
- EHEC Infektionsdosis < 100
- Inkubationszeit: 3-4 (2-10) Tage, HUS 7 (5-12) Tage
- Trägertum / Ausscheidung > 1 Monat möglich, Kinder länger
- **EHEC verursacht große Ausbrüche**
- Japan 1996 ~8000 (3) Radieschen Sprossen
- USA 1999 ~900 (2) Quellwasser
- Germany 2011 ~4000 (53) Bockshornklee Sprossen

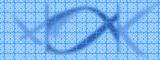
1. Einführung *E. coli* Pathovare



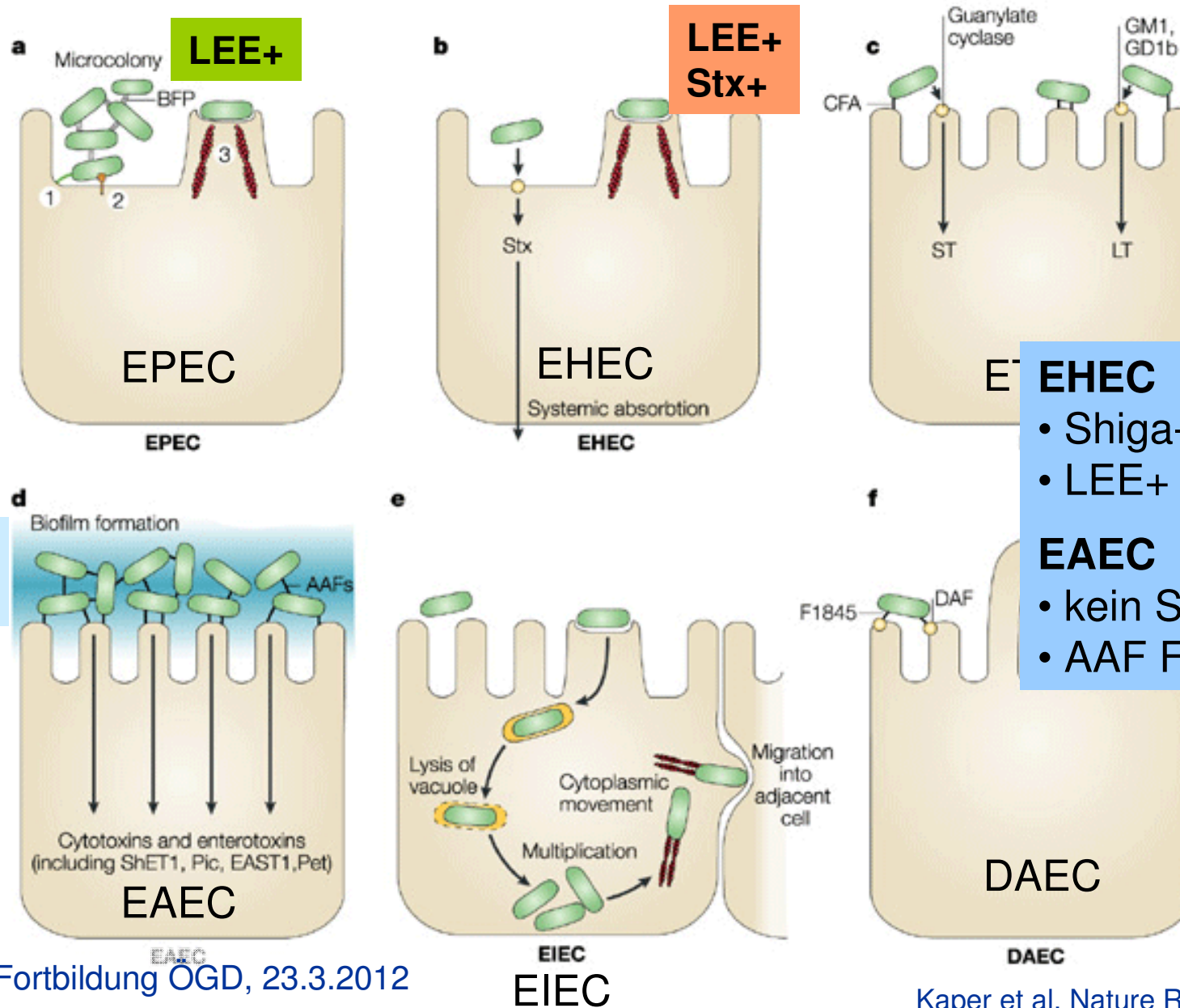
- Spezifische Gene definieren einen Pathovar

Pathovar	Virulenzfactor	Gen
EHEC/STEC	Shigatoxin Intimin Enterohemolysin	<i>stx1</i> und <i>stx2</i> <i>eaeA</i> <i>ehxA</i>
EAEC	Virulenzregulator Virulenzplasmid / AAF Fimbrien (P Fimbrien) (Aerobactin) (Yersiniabactin)	<i>aggR</i> pAA (<i>pap</i>) (<i>iucC</i>) (<i>Irp2</i>)
EPEC	Intimin Virulenzplasmid	<i>eaeA</i> EAF, <i>bfp</i>
ETEC	Enterotoxine Colonization factors	<i>lth, sth</i> <i>cfa</i>
EIEC	Invasin / Membranprotein Virulenzplasmid	<i>ipaH</i> <i>lal</i>

1. Einführung *E. coli* Pathovaren



- Pathovarspezifische Virulenzgen Sets

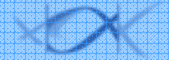


EHEC

- Shiga-like Toxin, Stx
- LEE+

EAEC

- kein Stx, kein LEE
- AAF Fimbrien +

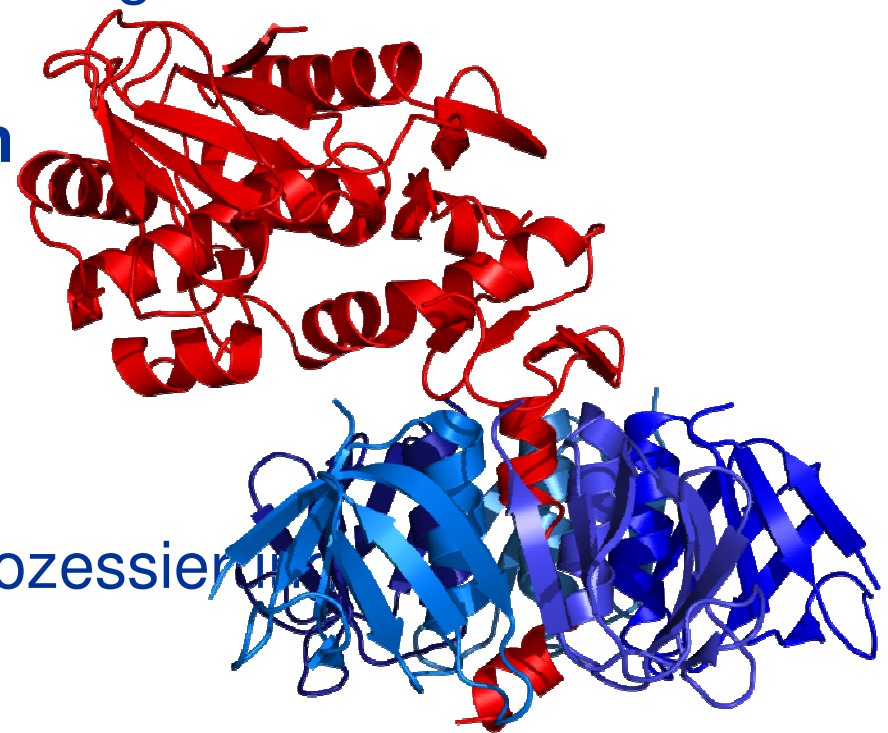


- Charakteristik von bedeutenden Virulenzdeterminanten

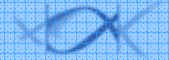
Shiga-(ähnl.) Toxin, Verotoxin

- *S. dysenteriae*, EHEC/STEC
- *stx1* und *stx2*, Teil von Lambdoiden Phagen
- Stx2 56% aa homolog zu Stx1
- **Stx2 HUS + 400-fach mehr toxisch**

- AB5 Toxin
- B bindet an spezifische Glycolipide (Globotriaosylceramide, Gb3)
- A Translokation in Wirtszelle und Prozessierung
- A1 bindet an Ribosom + **stoppt Proteinsynthese** (N-Glycosidase)

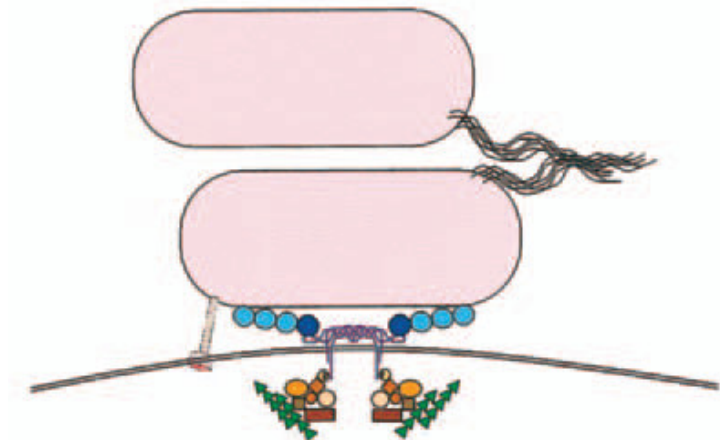
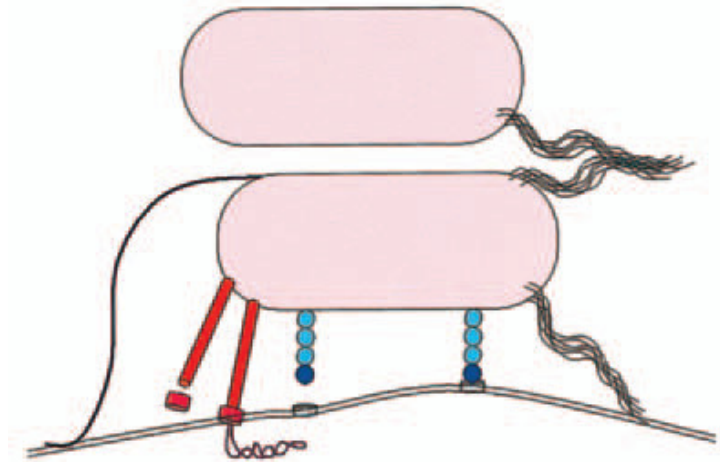


1. Einführung *E. coli* Pathovare

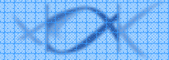


- Charakteristik von bedeutenden Virulenzdeterminanten

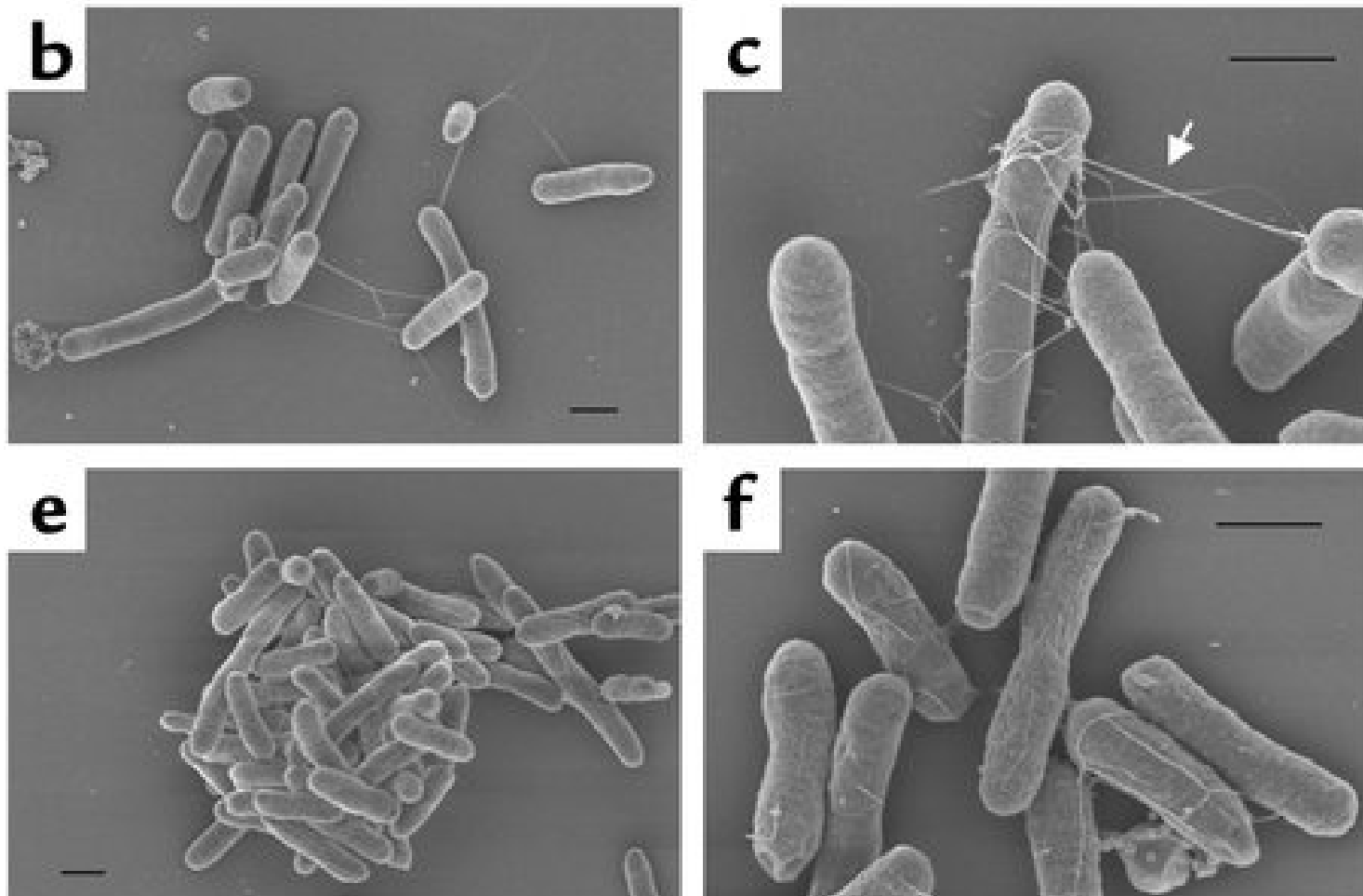
- **LEE Pathogenitäts Insel**
- kodiert Typ III Sekretionssystem und Effektorproteine, Translokation
- induziert „*enterocyte effacement*“

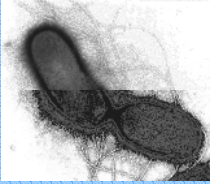


1. Einführung *E. coli* Pathovare



- Charakteristik von bedeutenden Virulenzdeterminanten
- **EAEC AAF Fimbrien**, pAA Virulenzplasmid, Autoaggregation





2. Arbeiten am NRZ



Donnerstag, 19. Mai 2011

- Info 3 Kinder mit HUS in Hamburg

Freitag, 20. Mai 2011

- HUS bei Erwachsenen in Hamburg und Frankfurt
- Kontakt zum KL HUS, Universität Münster

Montag, 23. Mai 2011

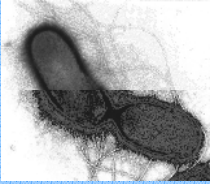
- Info 2 *E. coli* Kulturen, NRZ Eingang 19. und 20.5. könnten vom beginnenden Ausbruch stammen

„Routine“- Diagnostik PCR Ergebnisse nach Stammisolierung:

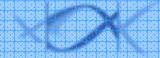
- *stx1*-Gene negativ
- ***stx2*-Gene positiv**
- *eaeA*-Gen negativ
- *ehx*-Gen negativ

Dienstag, 24. Mai 2011

- O-Antigen Typ: **O104** Serotypie



2. Arbeiten am NRZ

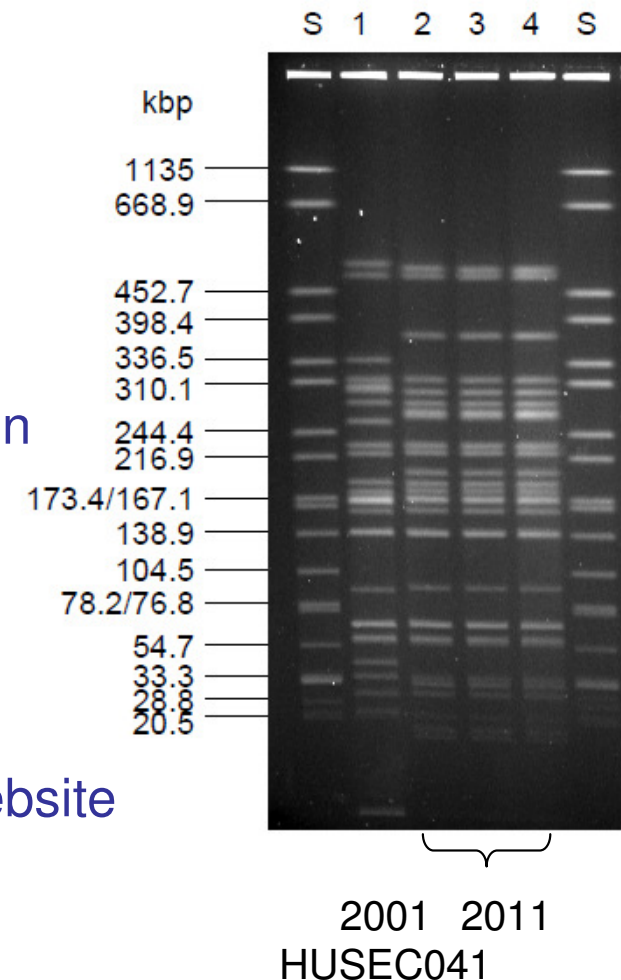


Mittwoch, 25. Mai 2011

- Shigatoxin-Typ: Stx2 Variante ***vtx2a*** (PCR)
- kompletter Serotyp: **O104:H4**
- Stamminfo auf RKI und EPIS website
- AB-Resistenz: **ESBL-Typ**
- Identische XbaI **PFGE Profile** von 5 Stammisolaten
- EAEC **pAA** Virulenzplasmid

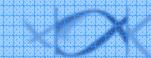
Dienstag, 26. Mai 2011

- Detaillierte Information über Diagnostik auf RKI website
- English 27.5.11





2. Arbeiten am NRZ



- Außergewöhnliche Erhöhung der Probeneinsendungen an das NRZ
- Einführung einer „*flow chart*“ für eine schnelle Ausbruchsstammdiagnose aufgrund der besonderen Stammeigenschaften
 - Zusätzliche Selektivkultur (Chromo-ID-ESBL)
 - Multiplex PCR *stx1/stx2* und *eaeA*
 - PCR Serotypie (*rfb*_{O104}, *fliC*_{H4}) * nach Bielaszewska, M. et al. Lancet, 2011
- Falldefinition für Diagnostik:
ESBL+ *stx1*- *stx2*+ *eaeA*- O104+ H4+
- Bereitstellung des Ausbruchsreferenzstammes RKI 11-02027 für nationale und internationale Referenzlaboratorien



2. Arbeiten am NRZ

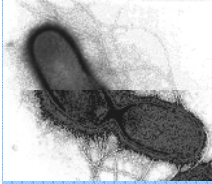


Vom 20. Mai 2011 bis 5. August 2011

3244 Probeneinsendungen an NRZ

- **1023 Proben: Ausbruchsstamm O104:H4**
- **702 Proben: EHEC Isolate, kein Ausbruchsstamm**
- 311 Isolate 42 verschiedene Serovare

- 53 Proben: EPEC-Isolate
- 1 Probe: EAEC (O175:H31)
- 590 Proben: kein pathogener *E. coli* detektiert
- 209 Proben PCR positiv, kein Stammisolat



3. EHEC O104 Ausbruchsstamm



- **EHEC / STEC**

Shiga Toxin 1 / <i>stx1</i> Gen:	negativ
Shiga Toxin 2 / <i>stx2</i> Gen (<i>vtx</i> 2a Variante):	positiv
Intimin / <i>eaeA</i> Gen:	negativ
Enterohemolysin / <i>ehxA</i> Gen:	negativ

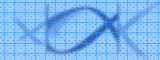
- **EAEC Virulenzplasmid**

<i>aatA</i> (ABC-Transporter Gen)	positiv
<i>aagR</i> (master regulator of vir-plasmid genes)	positiv
<i>aap</i> (secreted protein dispersin gene)	positiv
<i>aggA</i> (AAF/I -fimbrial subunit gene)	positiv
<i>aggC</i> (AAF/I -fimbrial operon gene)	positiv

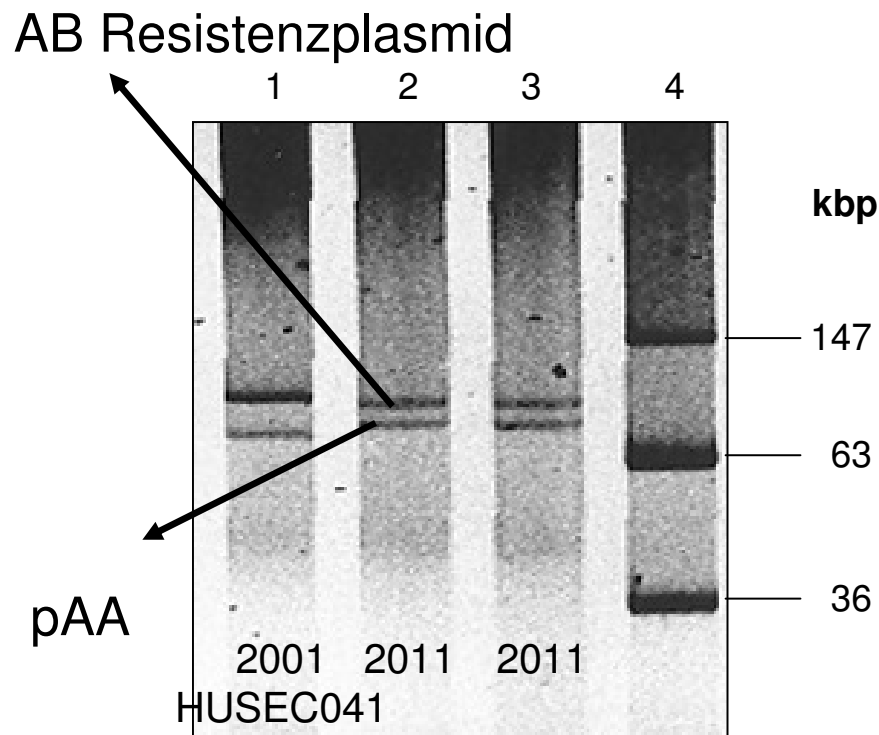
- **MLST Sequenztyp ST 678***

* H. Karch, KL HUS, Universität Münster

3. EHEC O104 Ausbruchsstamm



Vergleich des **Plasmid Profils** des Ausbruchsstammes *E. coli* O104:H4 and HUSEC041



lane 1: HUSEC041 from 2001
95kbp plasmid: *bla*TEM-1
75kbp EAEC virulence plasmid:
aatA, *aggR*, *aafIII*

lanes 2, 3: two isolates from outbreak 2011
90kbp plasmid: *bla*TEM-1,
***bla*CTX-M-15**
83kbp EAEC virulence plasmid:
aatA, *aggR*, *aafI*

lane 4: molecular weight standard *E. coli*
39R861

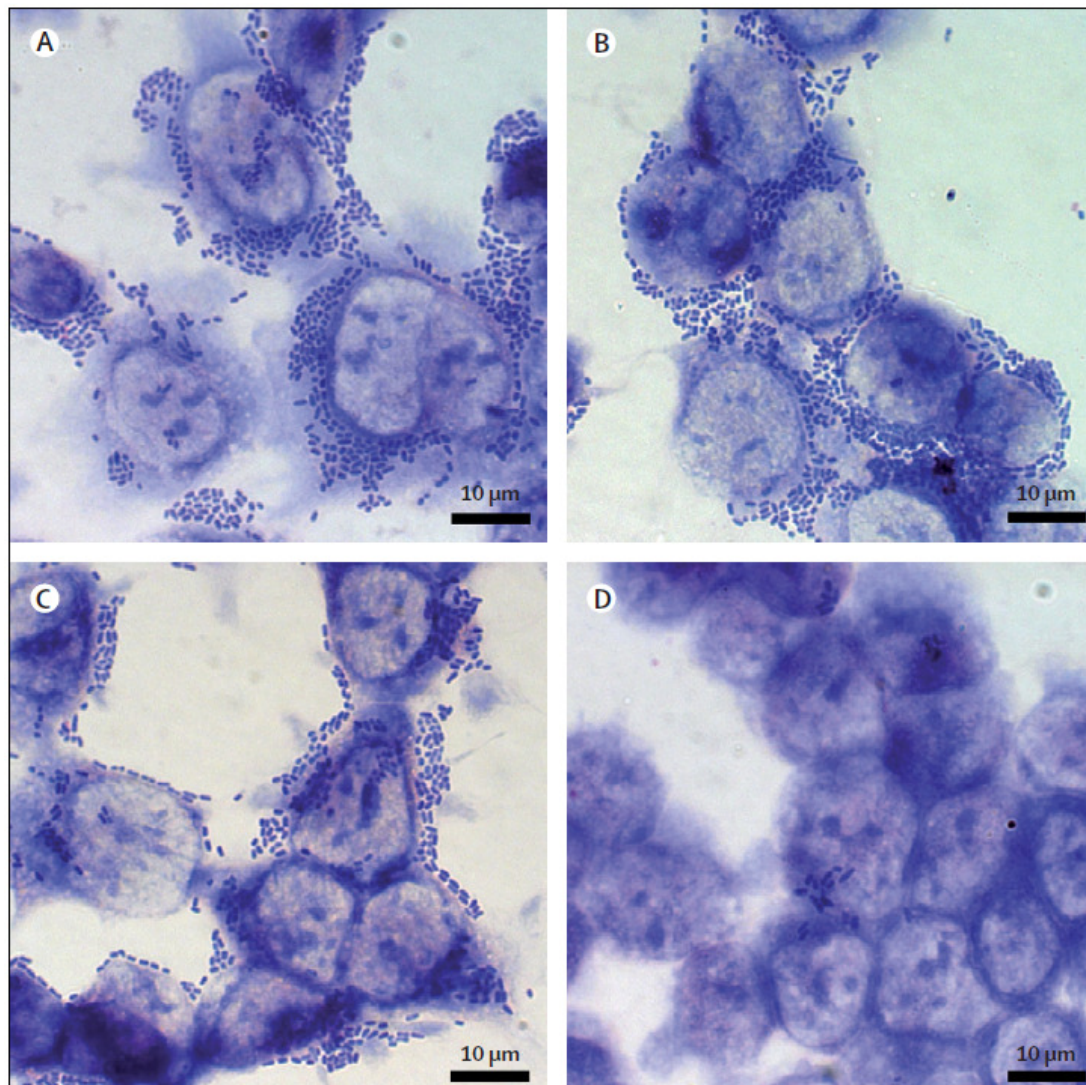
(Plasmidprofilanalyse nach Kado & Liu; J. Bact. Vol. 145, 3; 1365-1373)



3. EHEC O104 Ausbruchsstamm



Adhärenz an intestinales Epithel



”stacked-bricks”

A: outbreak strain (isolate LB226692)

B: EAEC - positive control

C: HUSEC041 (*E. coli* O104:H4)

D: HUSEC037 (*E. coli* O104:H21)

3. EHEC O104 Ausbruchsstamm



pAA und
Autoaggregation

K12 (C600)

2.5 µm

O157:H7 (EDL933)

2.5 µm

O104:H4 (RKI11-02027)

2.5 µm

O104:H4 (HUSEC041)

2.5 µm

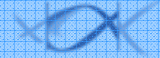
3. EHEC O104 Ausbruchsstamm



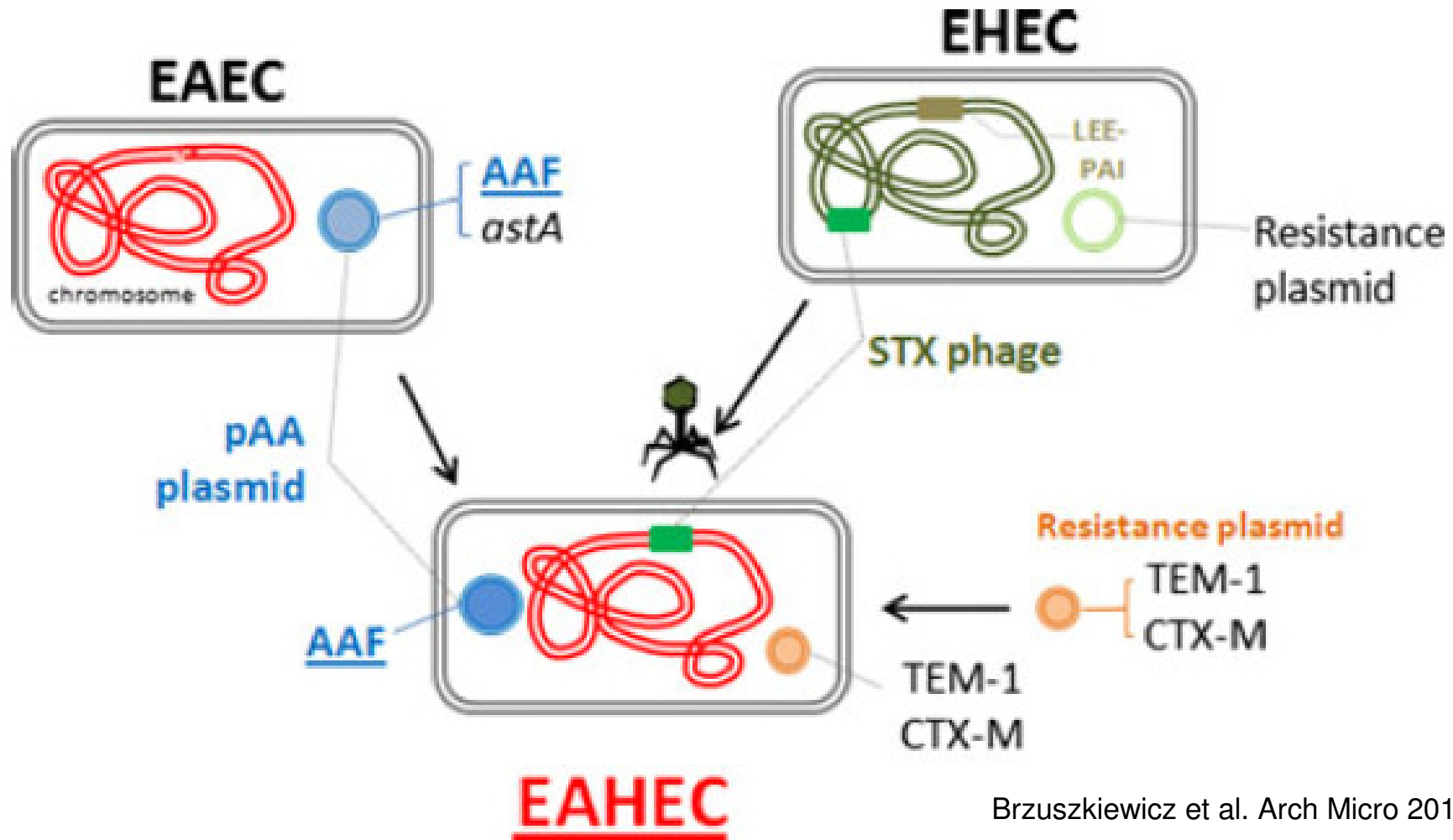
- EHEC/EAEC intermediärer Pathovar
- Breites AB-Resistenz Profil (8 AB Klassen, incl. 3rd Ceph, **ESBL Plasmid**)
- Spezielle Kolonisationsfaktoren AAF/I Fimbrien (**pAA Plasmid**)
- Stabiles Virulenz- und ABR-Profil und PFGE Profil im akuten Ausbruch
- Mind. 10 Ausbruchs- und 12 verwandte Stämme Genomsequenziert
- WGS: ähnlich zu EAEC 55989 und HUSEC041
- Schrittweise Aufnahme und Abgabe von chromosomalen und Plasmid-kodierten Genen

Bielaszewska et al. Lancet Inf Dis 2011, Frank et al. NEJM 2011, Scheutz et al. Eurosurv 2011, Brzuszkiewicz et al. Arch Micro 2011, Mellmann et al. PLOS One, Rohde et al. NEJM 2011, Rasko et al. NEJM 2011, Epid. Bull. 35/2011, HPA data

3. EHEC O104 Ausbruchsstamm

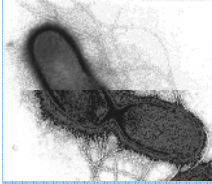


- Genom Sequenzierung bestätigt Hybrid Pathovar



Brzuszkiewicz et al. Arch Micro 2011

Also others: Frank et al. NEJM 2011, Bielasewska et al. Lancet Inf Dis, Scheutz et al. Eurosurv. 2011, Mellmann et al. PLOS One 2011, Rohde et al. NEJM 2011, Rasko et al. NEJM 2011



3. EHEC O104 Ausbruchsstamm



Offene wissenschaftliche Fragen zum Ausbruchsstamm

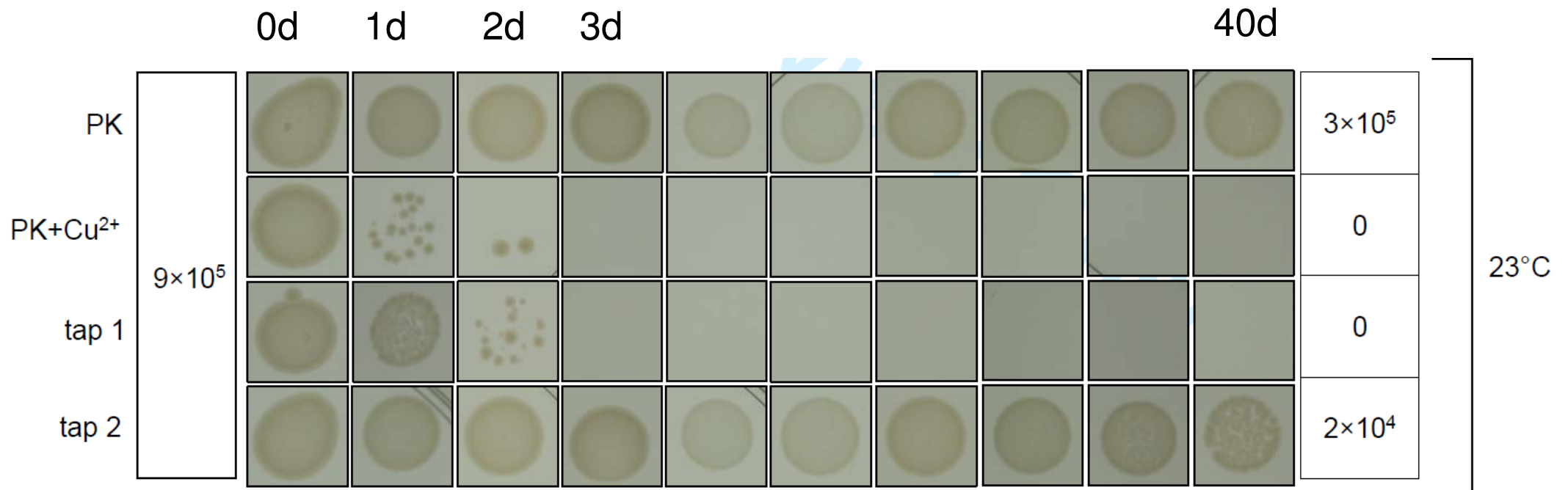
- Methoden für eine schnelle Identifizierung / verbesserte Detektion
- Stabilität des Geno- und Phänotyps (Microevolution)
- Erhöhte Virulenz? Spezielle Bedingungen für Ausbreitung?
- Pathogenetische Aspekte (*in vitro* / *in vivo* Modelle)
- Antimikrobielle Therapie ohne Risiko der Toxininduktion
- Reservoir (keine Tiere...)
- Persistenz im Menschen (Ausscheider) und in der **Umwelt**



3. EHEC O104 Ausbruchsstamm

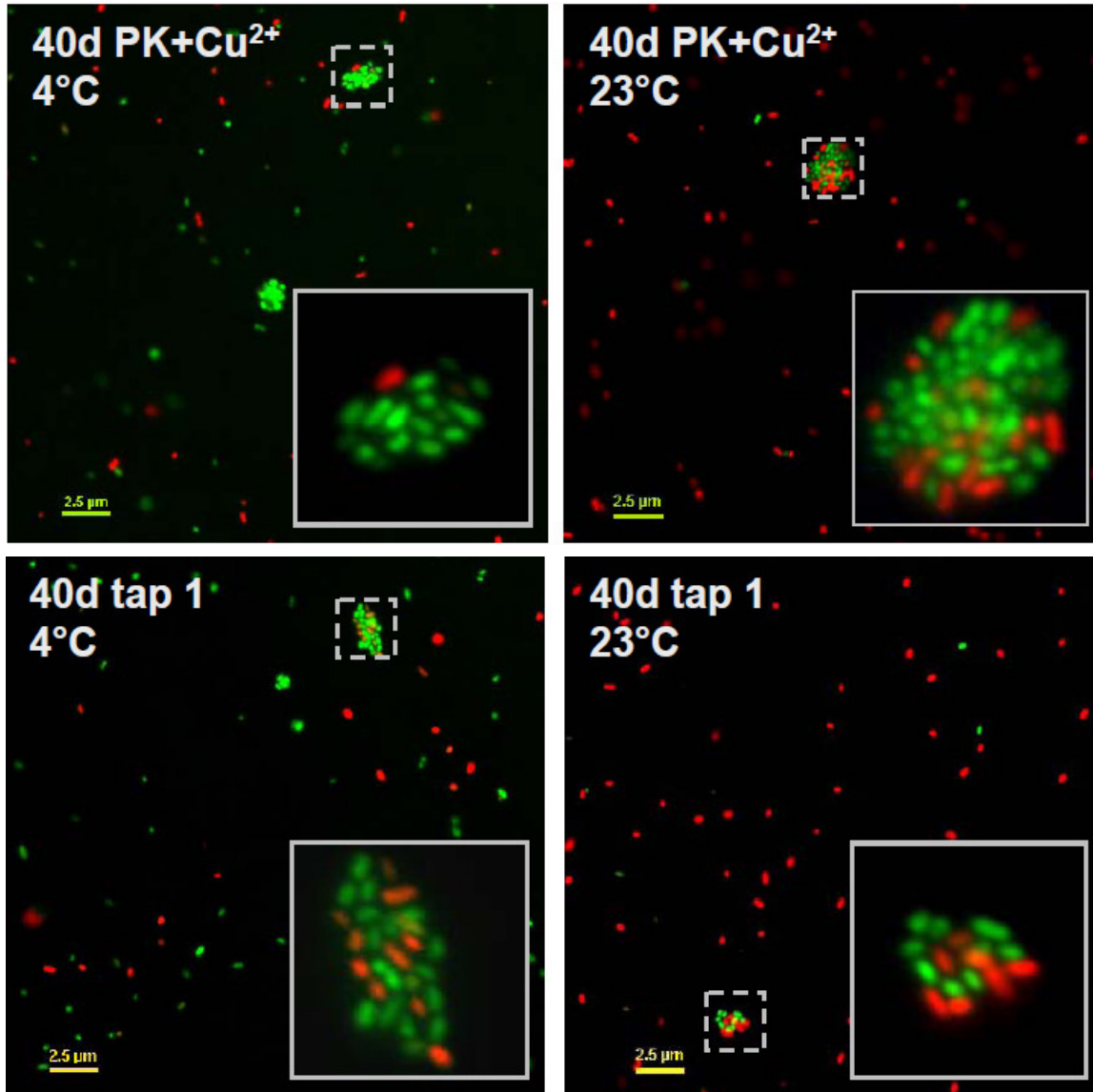
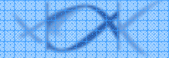


O104:H4 Ausbruchsstamm persistiert für mind. 40 Tage in wässriger Umgebung



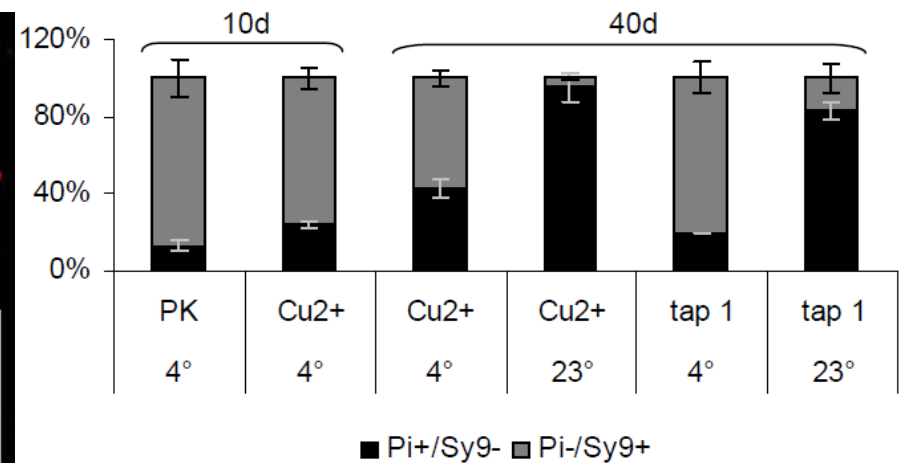


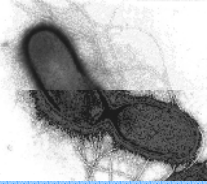
3. EHEC O104 Ausbruchsstamm



- intakte Bakterien sind auch da detektierbar, wo Bakterien nicht kultiviert werden konnten

- **VBNC!**





- Schnelle Charakterisierung des EHEC/EAEC O104:H4 Ausbruchsstammes
- besondere AB Resistenz und Besiedlungseigenschaften
- WGS zeitnah Einblick in Verwandtschaft und Eigenschaften des Stammes
- Erste Ergebnisse zur Persistenz im Menschen und in wässrigen Umgebungen sowie zum Phänomen der Nichtkultivierbarkeit
- „Gemischte“ *E. coli* Pathovaren mögliche „*emerging pathogens*“?
- → Mehr Forschung

Dankeschön an

- **RKI NRZ/FG11: E. Tietze, R. Prager, A. Fruth, W. Rabsch, C. Lang, S. Halbedel, P. Auraß**
- **+ alle Mitarbeiter**

- **RKI Abteilung 1: M. Mielke**

- **RKI/FG13: W. Witte, F. Layer, Y. Pfeifer**

- **RKI Abteilung 3: G. Krause, C. Frank, D. Werber, M. Faber, K. Stark**

Uni Münster KL HUS: H. Karch, M. Bielaszewska, A. Mellmann

- **Alle Stammeinsender**