



Untersuchungen zur Bedeutung von Lebensmittel-assoziierten Subtilase Zytotoxin-bildenden STEC

Herbert Schmidt

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene
Universität Hohenheim

■ Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

■ Hämorrhagische Kolitis, hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)

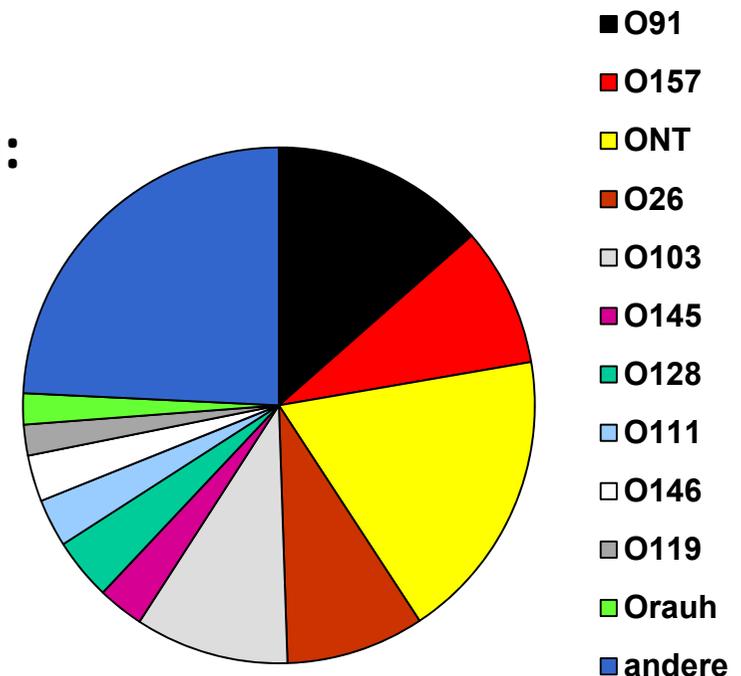
■ Lebensmittelinfektionen

■ Klinisch wichtige Serogruppen:

O157, O26, O91, O103, O111, O145

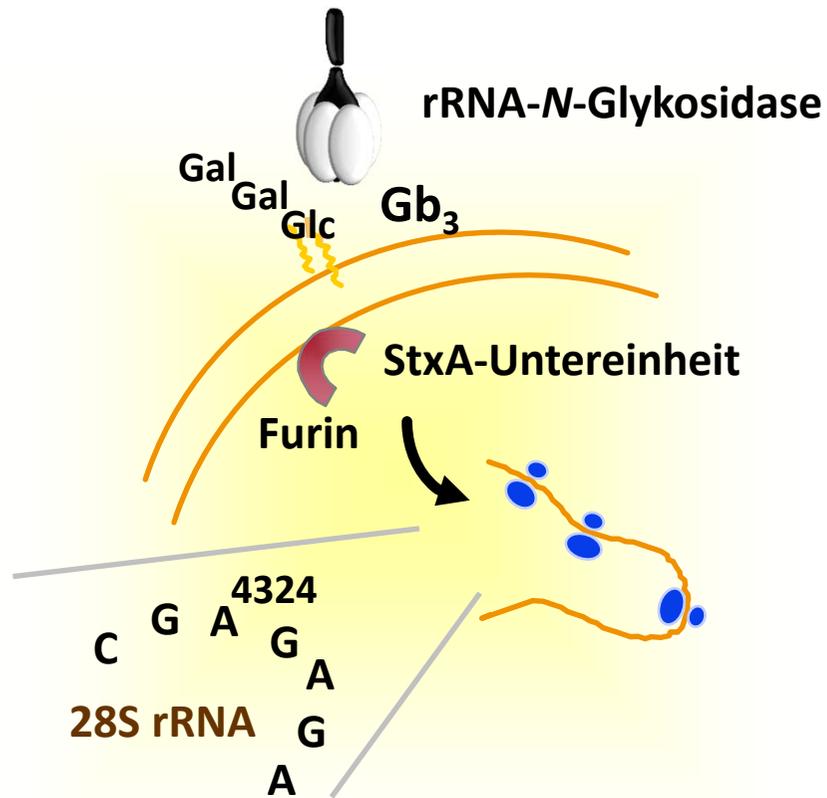
Serogruppen gemeldeter EHEC
in Deutschland, 2014 (n=324)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch,
2015, RKI

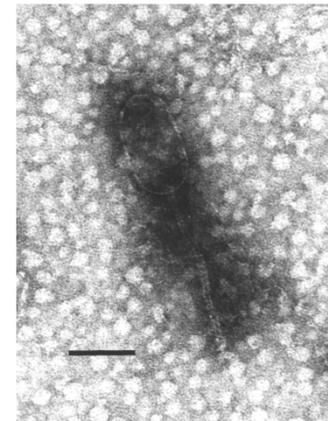


Shiga Toxin (Stx)

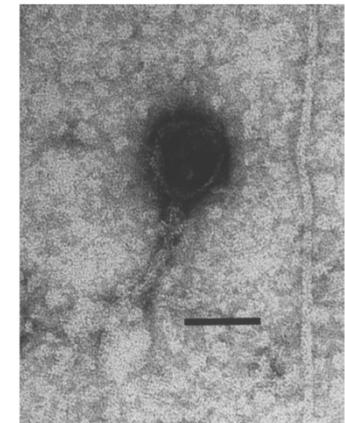
- Toxinfamilie: Stx1, Stx2, Varianten
- A:B₅ Struktur
- Eukaryotischer Rezeptor: Globotriaosylceramid (GB₃)



φH-19B
(*stx*₁)



φ933W
(*stx*₂)

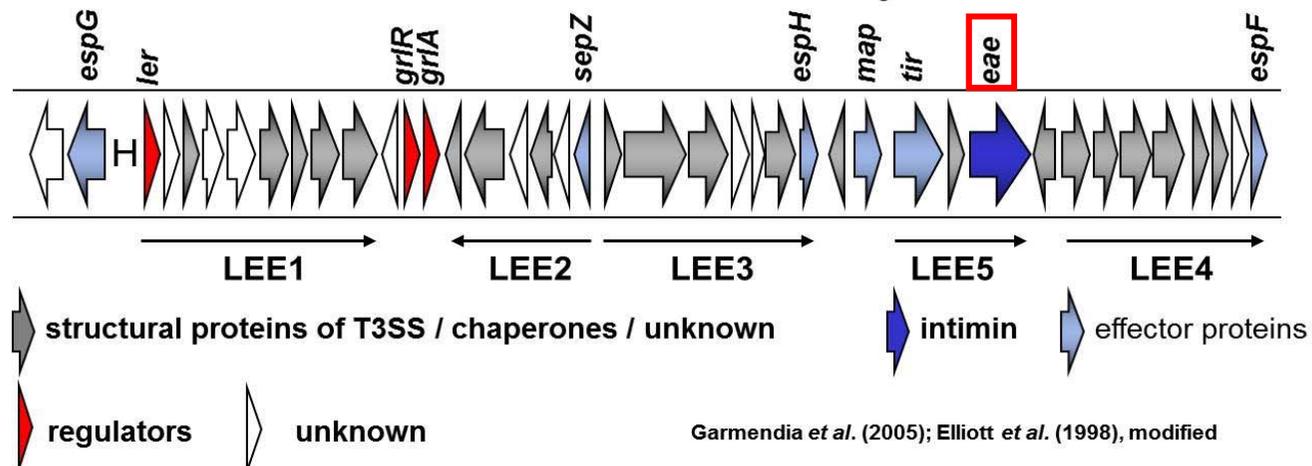
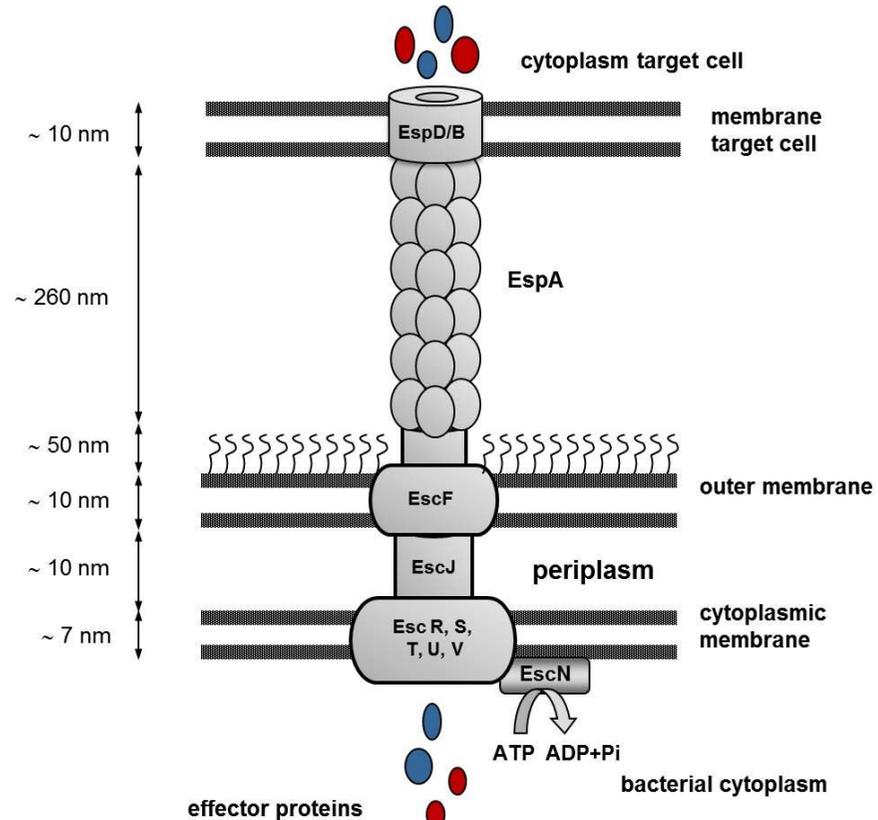


Lambdaoide Phagen

Der Locus of Enterocyte Effacement (LEE)



Rosenshine, S., et al., (1996).
EMBO J. 15:2613-24.

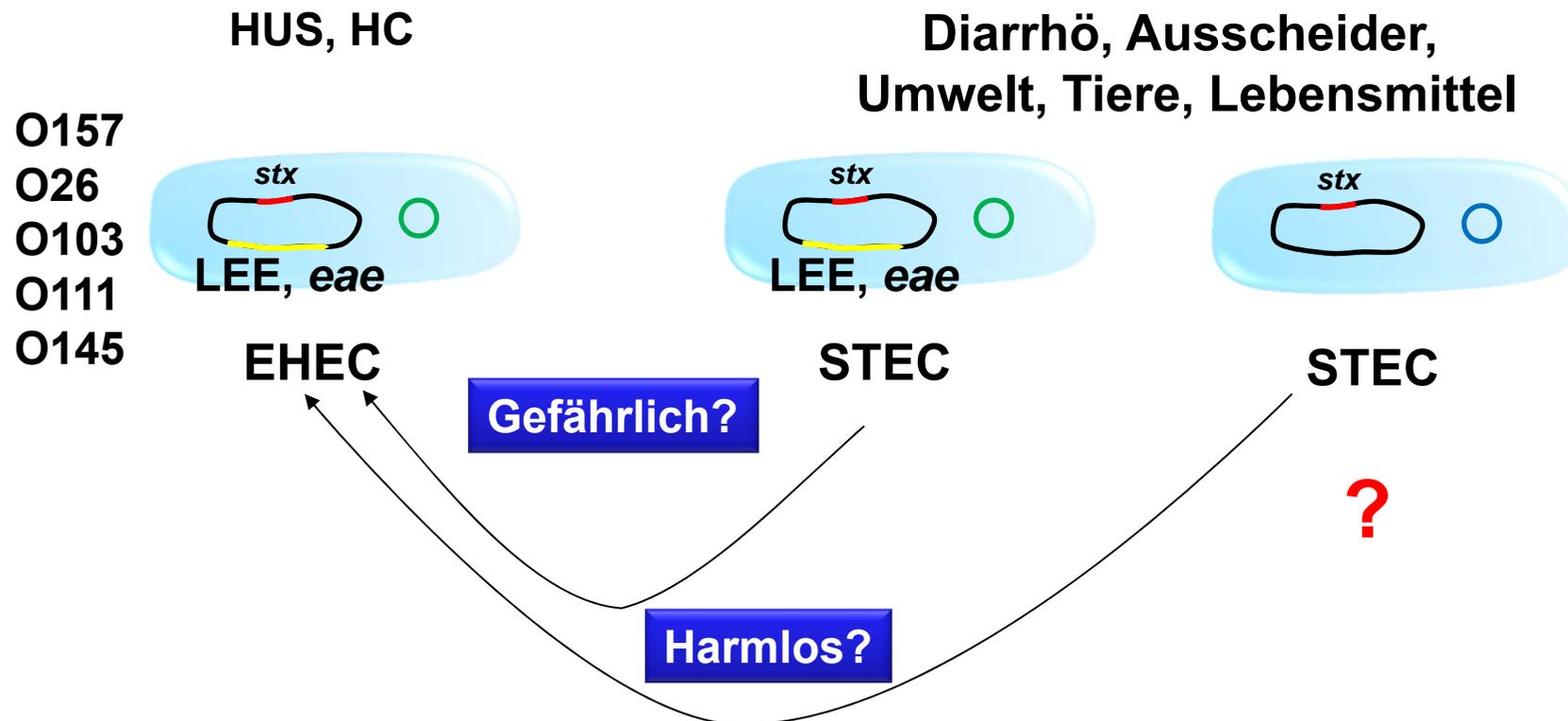


Garmendia et al. (2005); Elliott et al. (1998), modified

■ BMBF-Projekt FBI-ZOO (2008-2014)

Foodborne Zoonotic Infections of Humans

Molekulare Untersuchungen an Tier-, Lebensmittel- und humanen STEC-Isolaten mit dem Ziel einer Risikoeinschätzung



„The Big Five“

CEN ISO/TS_13136:2012

Virulenzgene von 75 STEC-Lebensmittelisolaten

<i>stx</i> ₁ *	<i>stx</i> ₂ *	<i>eae</i>	<i>nleA</i>	<i>cif</i>	<i>ehxA</i>	<i>espP</i>	<i>subAB</i>	<i>cdtV</i>	<i>iha</i>	<i>efa1</i>	Anzahl	
	+										22	
	+								+		10	
+											4	
+	+				+	+			+		5	
	+				+	+	+		+		4	
	+						+		+		2	
+	+				+	+	+		+		3	
	+				+		+		+		4	
	+					+			+		1	
+						+			+		2	
+	+						+		+		1	
	+				+	+			+		1	
+	+				+				+		1	
+	+					+					1	
	+						+				1	
+	+	+	+	+	+				+	+	1	O26:H11
+	+	+		+	+					+	1	O103:H2
	+				+	+		+	+		1	
	+				+		+	+	+		1	O113:H21
	+				+			+	+		1	
+	+				+		+		+		1	
+	+				+		+				1	
	+	+	+		+	+					1	O156:NM
	+	+	+		+	+			+	+	1	O157:H7
+	+				+				+		1	
	+				+						1	
	+				+	+	+	+	+		1	O113:H21

**stx*₁ bzw. *stx*₂ oder Varianten

■ Ziele



- **Untersuchungen zur genetischen Lokalisation, Regulation und Expression der Gene für die Subtilase SubAB**
 - Alle offenen Leserahmen komplett?
 - Plasmid-/chromosomalkodiert
 - Kodieren die Gene für funktionelle Toxine ?
- **Untersuchungen zum Wirkmechanismus von SubAB**
 - HeLa-, Verozellen
- **Verbreitung der SubAB Toxine**

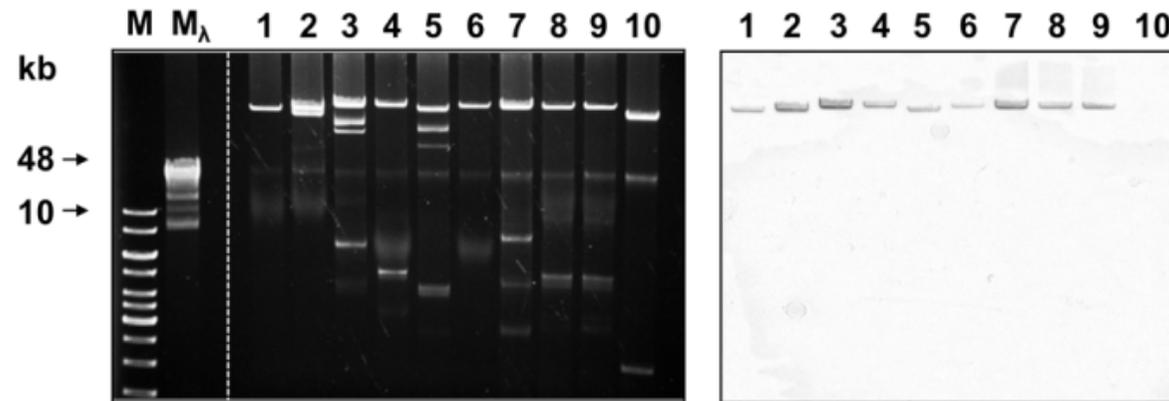
■ Charakteristika der *subAB*-positiven STEC-Stämme

Stamm	Serotyp	Herkunft	stx-Typ
K17f	O22:H8	Rohmilch	<i>stx</i> ₂
LM5602/08	O22:H8	Limetten-Tee	<i>stx</i> ₂
CB11588	O102:NM	Speck	<i>stx</i> ₂
CB11633	O179:H8	Mettwurst	<i>stx</i> ₂
TS20/08	O153:HNT	Hackfleisch	<i>stx</i> _{1/2}
TS26/08	O179:H8	Hackfleisch	<i>stx</i> _{1/2}
SF16b	ONT:H11	Hackfleisch	<i>stx</i> _{1/2}
TS18/08	O113:H21	Hackfleisch	<i>stx</i> ₂
TS30/08	O113:H21	Hackfleisch	<i>stx</i> ₂
LM27555	OR:NM	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂
LM14960	O23:NM	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂
LM27558 _{stx1}	O128:HNT	Rehfleisch	<i>stx</i> _{1/2}
LM14603/08	O21:H21	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂
LM16092/08	O21:H21	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂
LM27553 _{stx2}	O110:H31	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂
LM27553 _{stx1}	O75:H8	Rehfleisch	<i>stx</i> _{1/2}
LM27564	O113:NM	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂
LM27558 _{stx2}	OR:H43	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂

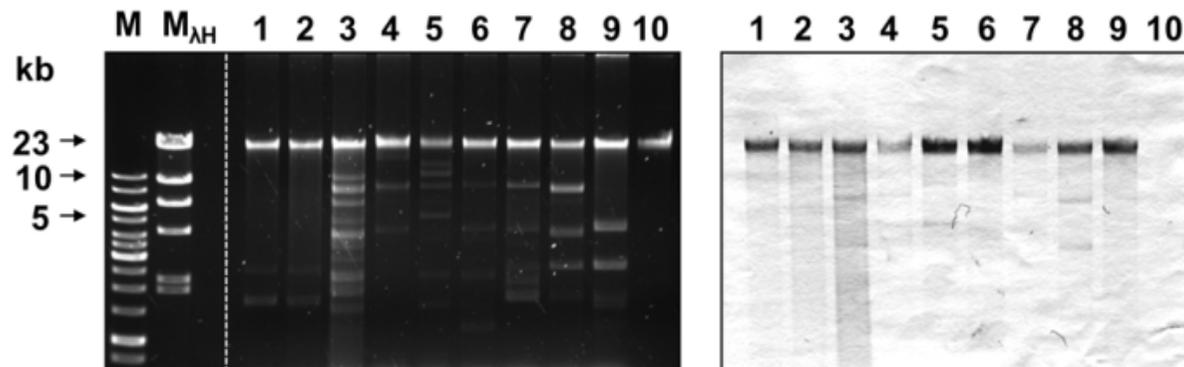
- 18 Stämme positiv für ein Genfragment von *subAB*
- Zusätzlich Gene für *stx*₁, *stx*₂, *stx*₁/*stx*₂
- Alle Stämme LEE-negativ
- Isolate aus verschiedenen Lebensmitteln sowie Rehfleisch (blau hinterlegt)
- zusätzlich gen. Information für *cdt-V* (gelb hinterlegt)
- Zwei Stämme mit gleichem Serotyp wie 98NK2 (O113:H21)

■ Genomische Lokalisation der *subAB*-Gene

Plasmid-DNA (links) von STEC Stämmen und Southern Blot Hybridisierung (rechts) mit einer *subAB* spezifischen DNA Sonde.



Chromosomale DNA (links) von STEC-Stämmen und Southern Blot Hybridisierung mit einer *subAB* spezifischen DNA Sonde (rechts).



Molecular analysis of subtilase cytotoxin genes of food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli* reveals a new allelic *subAB* variant

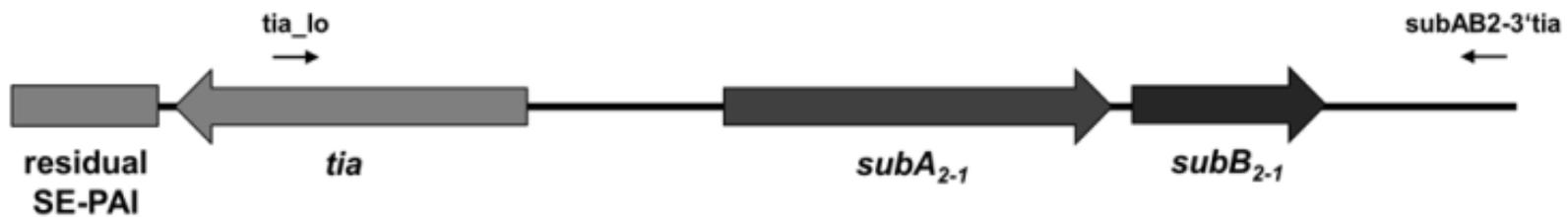
Joschua Funk, Helen Stoerber, Elisabeth Hauser and Herbert Schmidt*

Genetische Struktur und Genumgebungen der *subAB*-Varianten

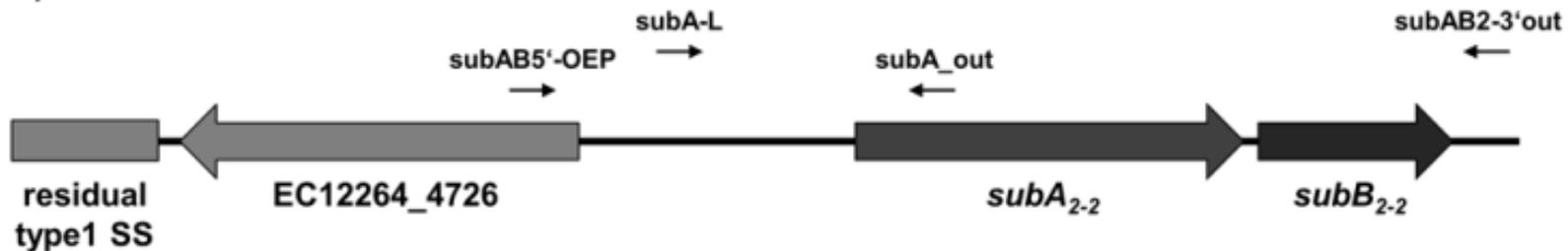
A) Plasmid



B) SE-PAI Chromosom



C) OEP-Locus Chromosom

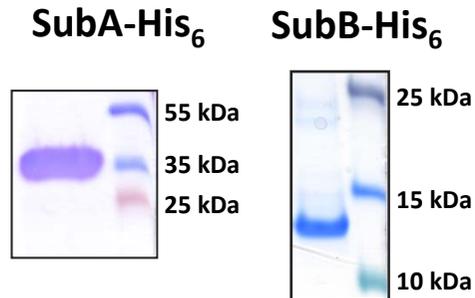
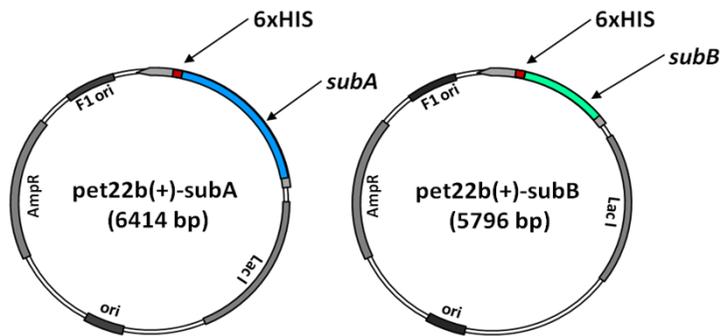


Stamm-Charakteristika, Ergebnisse der genetischen Analyse der verschiedenen *subAB*-Loci und assoziierte Virulenzgene

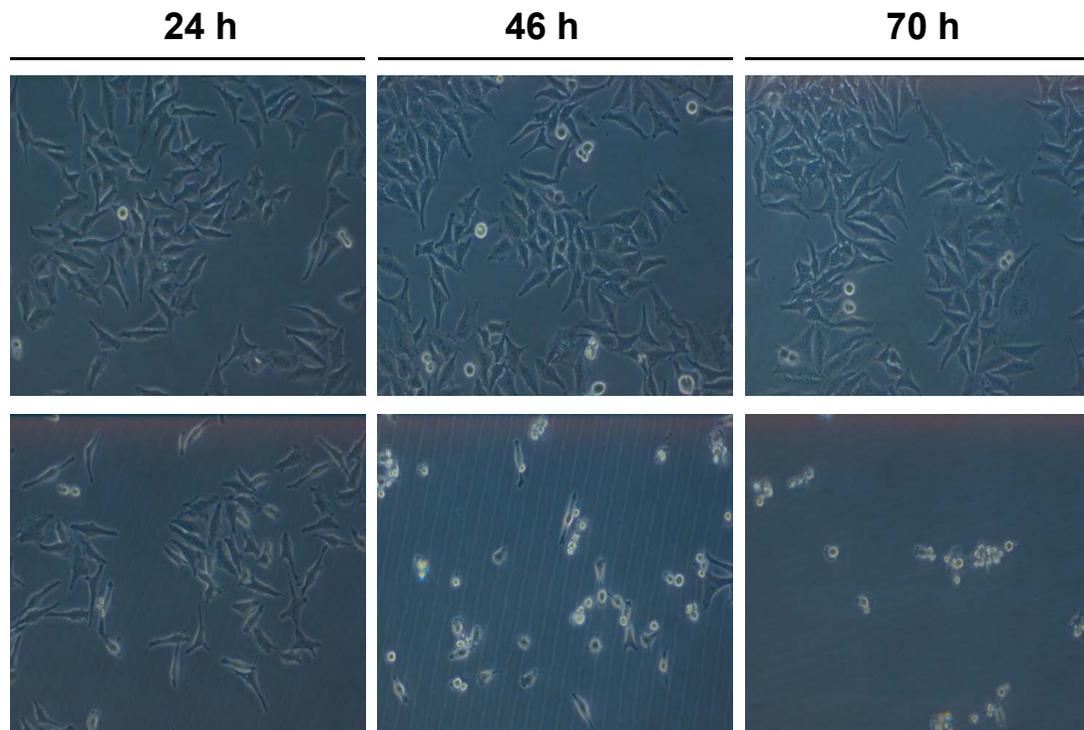
Stamm	Serotyp	Herkunft	<i>stx</i> -Typ	<i>tia</i>	<i>saa</i>	<i>subAB</i> ₁	<i>subAB</i> ₂₋₁	<i>subAB</i> ₂₋₂
K17f	O22:H8	Rohmilch	<i>stx</i> ₂	-	+	+	-	-
LM5602/08	O22:H8	Limetten-Tee	<i>stx</i> ₂	-	+	+	-	-
CB11588	O102:NM	Speck	<i>stx</i> ₂	-	+	+	-	-
CB11633	O179:H8	Mettwurst	<i>stx</i> ₂	-	+	+	-	-
TS20/08	O153:HNT	Hackfleisch	<i>stx</i> _{1/2}	-	+	+	-	-
TS26/08	O179:H8	Hackfleisch	<i>stx</i> _{1/2}	+	+	+	-	-
SF16b	ONT:H11	Hackfleisch	<i>stx</i> _{1/2}	-	+	+	-	-
TS18/08	O113:H21	Hackfleisch	<i>stx</i> ₂	-	+	+	-	-
TS30/08	O113:H21	Hackfleisch	<i>stx</i> ₂	-	+	+	-	-
LM27555	OR:NM	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂	+	-	-	+	-
LM14960	O23:NM	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂	+	-	-	+	-
LM27558 _{stx1}	O128:HNT	Rehfleisch	<i>stx</i> _{1/2}	+	-	-	+	-
LM14603/08	O21:H21	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂	+	-	-	-	+
LM16092/08	O21:H21	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂	+	-	-	-	+
LM27553 _{stx2}	O110:H31	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂	+	-	-	-	+
LM27553 _{stx1}	O75:H8	Rehfleisch	<i>stx</i> _{1/2}	+	-	-	+	+
LM27564	O113:NM	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂	+	-	-	+	+
LM27558 _{stx2}	OR:H43	Rehfleisch	<i>stx</i> ₂	+	-	-	+	+

Nach Funk et al., 2013. BMC Microbiology, 13:230

Biologische Aktivität von rekombinantem SubAB1



→ Im Westernblot durch spez. AK erkannt



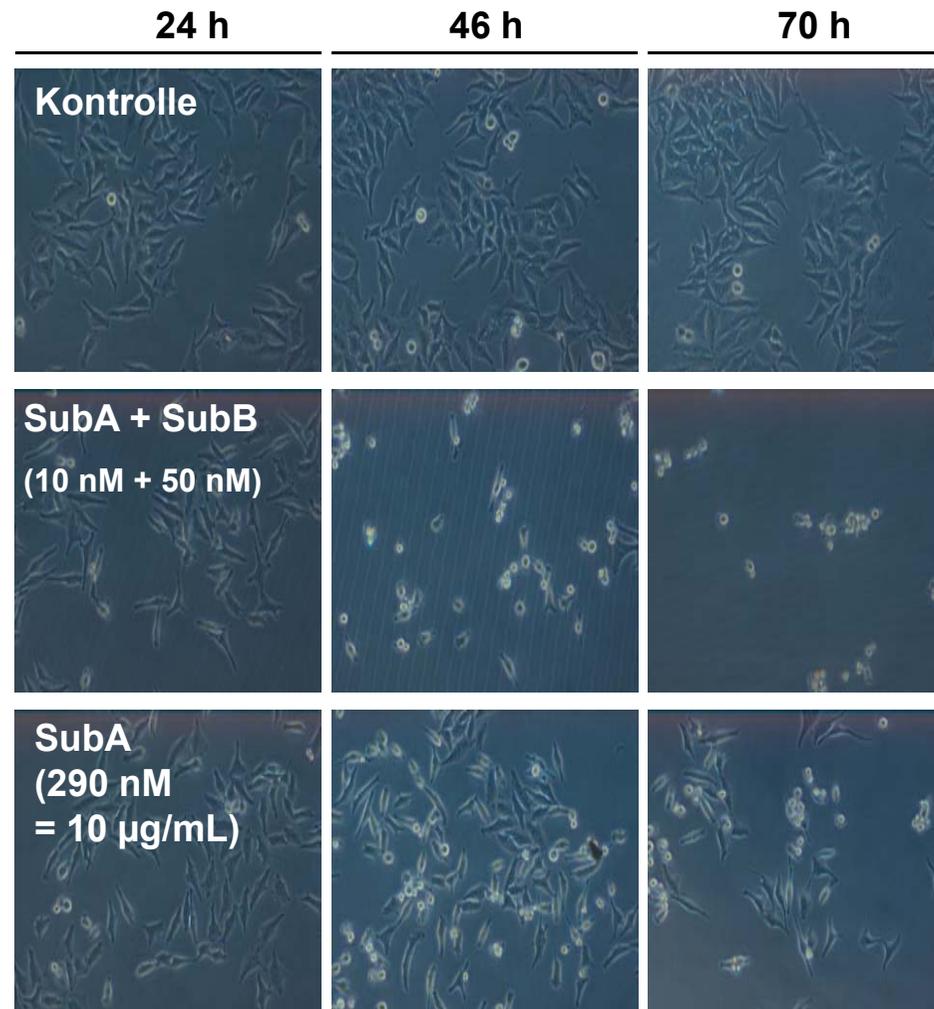
Funk *et al.*, 2015

Kontrolle

SubA + SubB
(10 nM + 50 nM)

- In vitro gemischtes SubA1 + SubB1 bildet biologisch aktive SubAB1 Komplexe
- In niedrigen Konzentrationen hat SubA1 alleine keinen Effekt auf Verozellen.

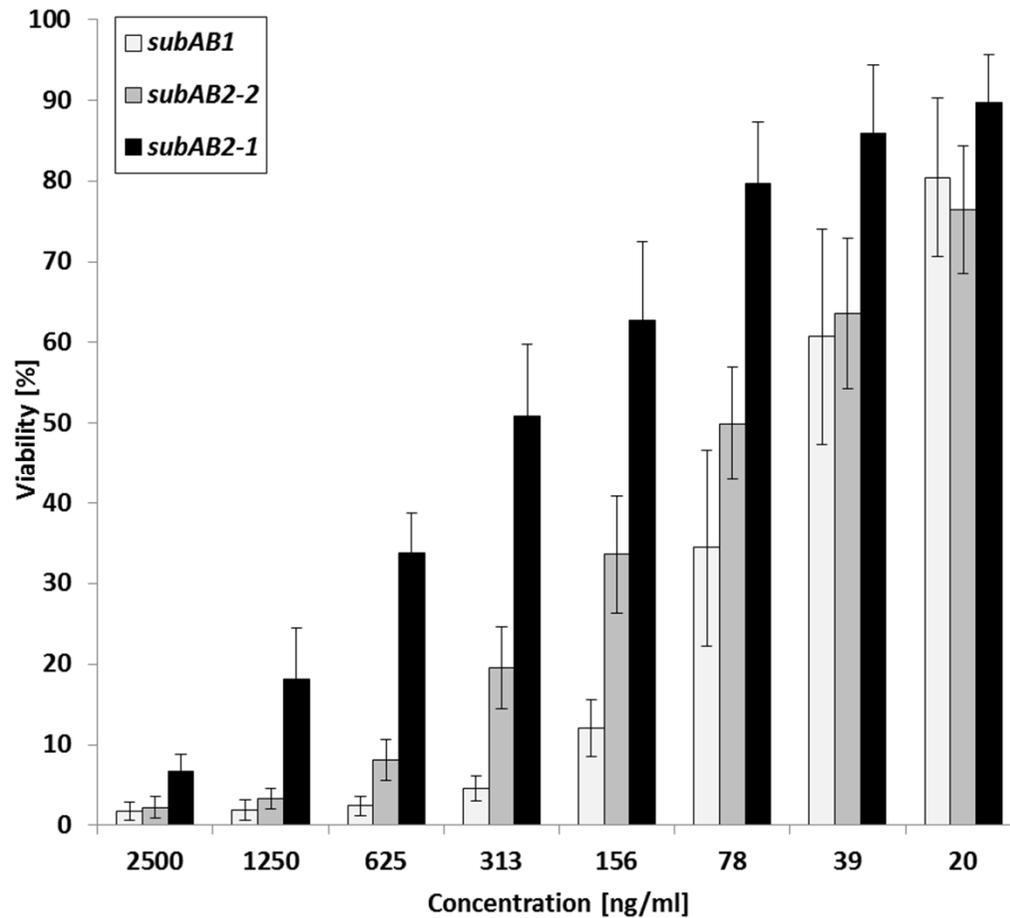
Biologische Aktivität von rekombinantem SubAB1



Funk *et al.*, 2015

- In höheren Konzentrationen wirkt SubA1 alleine zytotoxisch auf Zellen:
Abrundung, reduzierte Anzahl!

Zytotoxizität der rekombinanten SubAB-Varianten



LD₅₀-Werte:

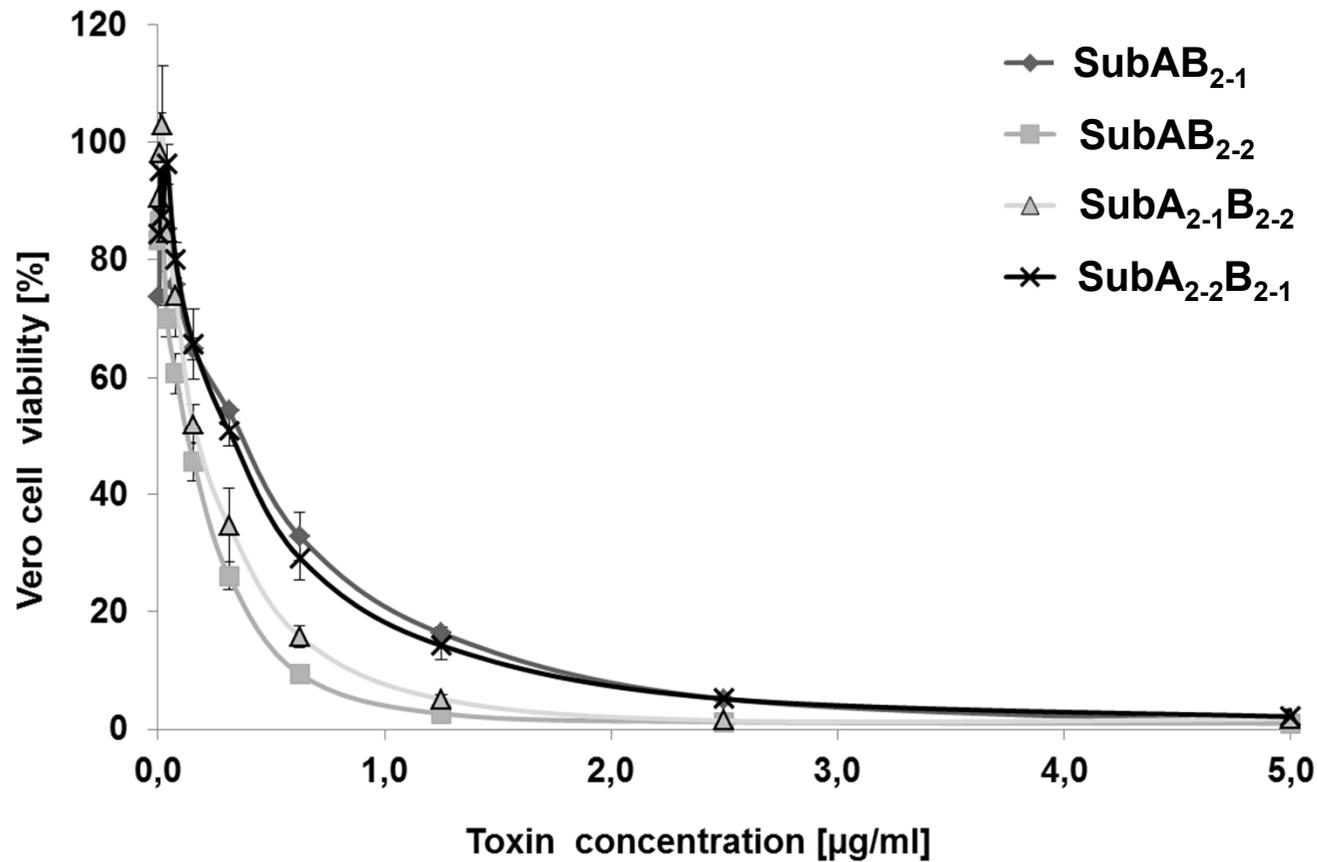
SubAB₁ ~ 50 ng/mL

SubAB₂₋₁ ~ 300 ng/mL

SubAB₂₋₂ ~ 75 ng/mL

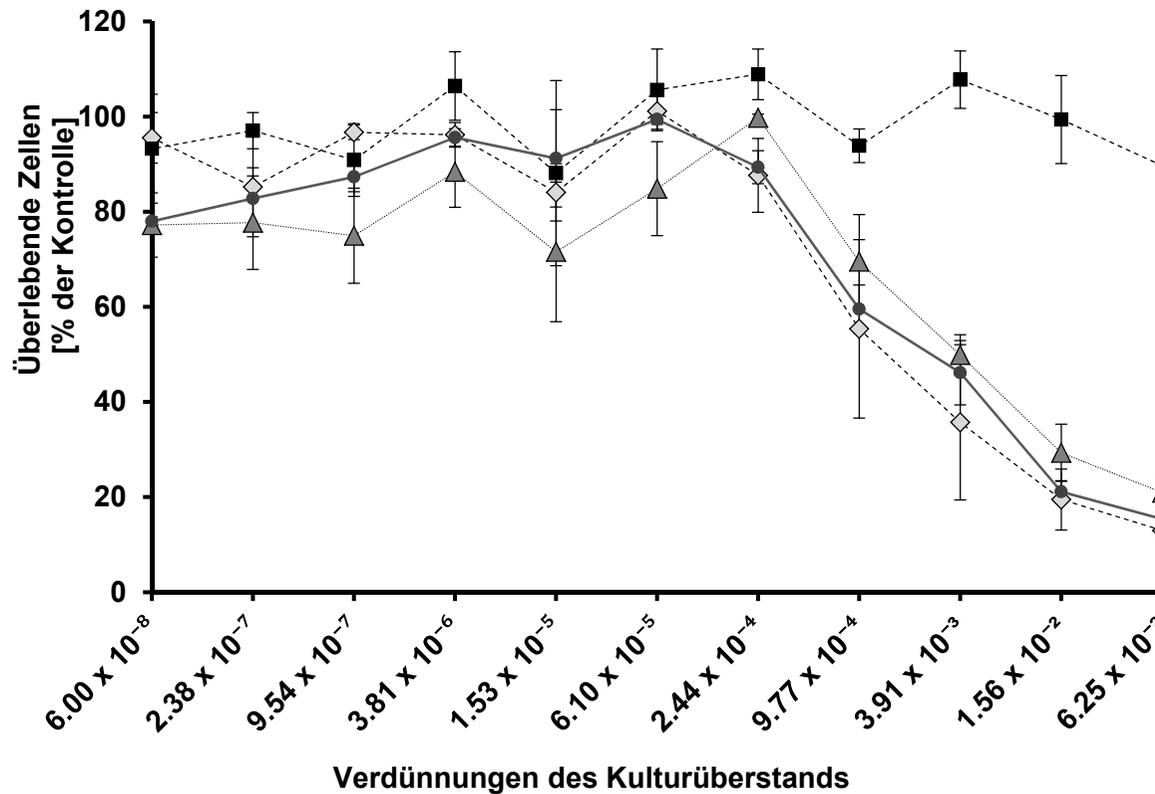
Funk *et al.*, 2015

Zytotoxizität hybrider SubAB-Mischungen auf Verozellen



LD₅₀-Werte
SubAB₂₋₁ ~ 300 ng/ml
SubAB₂₋₂ ~ 110 ng/ml
SubA₂₋₁B₂₋₂ ~ 175 ng/ml
SubA₂₋₂B₂₋₁ ~ 285 ng/ml

■ Überlebende Verozellen nach Inkubation mit Kulturüberständen verschiedener Deletionsmutanten des *E. coli* O113:H21 Stamms TS18/08.



TS18/08-3 ($\Delta stx_{2-1} \Delta stx_{2-2} \Delta cdt-V$)

(hellgraue Raute)

TS18/08-3 3 h

(graue Dreiecke)

TS18/08-4 ($\Delta stx_{2-1} \Delta stx_{2-2} \Delta cdt-V \Delta subAB_1$)

(schwarze Quadrate)

TS18/08-4 ($\Delta stx_{2-1} \Delta stx_{2-2} \Delta cdt-V \Delta subAB_1$) / pWSK29-*subAB*₁

(dunkelgraue Kreise)

■ Chromosomale *subAB*-Varianten kommen häufig bei STEC von Wildwiederkäuern, Schafen, Ziegen und Rehen vor

Wirt / Quelle	Anzahl der Stämme	Anzahl subAB-positive Stämme	Anzahl <i>subAB</i> ₁	Anzahl <i>subAB</i> ₂₋₁	Anzahl <i>subAB</i> ₂₋₂	Anzahl <i>subAB</i> ₂₋₁ und <i>subAB</i> ₂₋₂
Steinbock	6	6	0	0	1	5
Gemse	12	11	0	0	6	5
Rotwild	19	10	0	0	7	3
Rehwild	15	4	0	0	1	3
Schaf	60	39	0	1	17	21
Rind	19	0	0	0	0	0
Schwein	21	0	0	0	0	0
Gesamt (%)	152	70 (45,5)	0 (0)	1 (1,4)	32 (45,7)	37 (52,9)

Nach: Nüesch-Inderbinen et al., 2015. Intern. J. Med. Microbiol. 305:124–128

■ Zusammenfassung und Ausblick

- **18 *subAB*-positive STEC-Stämme, komplette Gene, neue chromosomale Varianten beschrieben, unterschiedliche genetische Loci**
- **Neuer Wirkmechanismus (SubA)**
- **Die Subtilase trägt zur Zytotoxizität der STEC bei**
- **SubAB häufig bei STEC-Stämmen von Schafen und Wildwiederkäuern gefunden**
- **Neue diagnostische Verfahren zum Nachweis von SubAB ?**
- **Welche Rolle spielen SubAB-positive STEC-Stämme im klinischen Geschehen?**

■ **Danke.....**

AG Schmidt: Elisabeth Hauser

**Tina Slanec
Joschua Funk
Carolin Reich**

Universität Ulm: AG Holger Barth

Universität Zürich: AG Roger Stephan

FBI ZOO: Lothar Wieler (Spr.) Helge Karch, und Kollegen