

Aus dem
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Vergleichende molekulare, epidemiologische und phylogenetische
Untersuchungen zur Anpassung von *Escherichia coli*
bei Wild- und Hausschweinen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Antje Römer
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3328

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Escherichia coli, pigs, wild pigs, boars, digestive tract, commensals, microbial flora, phylogeny, genetic diversity, epidemiology, polymerase chain reaction, pulsed field electrophoresis

Tag der Promotion: 25.11.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-744-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch** verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

ABBILDUNGEN	IV
TABELLEN.....	VI
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	VIII
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM.....	2
2.1 Interspezifische Wechselbeziehungen.....	2
2.1.1 Symbiose	2
2.1.2 Kommensalismus	3
2.1.3 Prädation/ Parasitismus	3
2.1.4 Neutralismus/Koexistenz.....	4
2.1.5 Amensalismus	4
2.1.6 Konkurrenz/Konkurrenz.....	4
2.2 Modelle des Kommensalismus.....	5
2.2.1 Reiner Kommensalismus.....	5
2.2.2 Kommensalismus mit Substratkonkurrenz	6
2.2.3 Kommensalismus mit Kreuzinhibition	6
2.3 Mikrobielle Darmflora	7
2.3.1 Die gastrointestinale Mikroflora.....	7
2.3.2 Bakterielle Populationsgruppen und Habitate im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren	9
2.3.3 Die Mikroflora im porzinen Gastrointestinaltrakt	10
2.4 Interaktionen zwischen Wirt und gastrointestinaler Mikroflora	11
2.4.1 Positive Effekte der mikrobiellen Darmflora auf den Wirtsorganismus	12
2.4.2 Negative Effekte der mikrobiellen Darmflora auf den Wirtsorganismus	14
2.4.3 Mikrobielle Interaktionen	15
2.5 Die Entwicklung der Darmmikroflora beim Schwein	15
2.6 <i>Escherichia coli</i>	17
2.6.1 Das Bakterium <i>Escherichia coli</i>	17
2.6.2 Pathogene <i>E. coli</i>	17
2.6.3 <i>E. coli</i> im porzinen Gastrointestinaltrakt.....	19
3. MATERIAL.....	20
3.1 Herkunft der verwendeten <i>E. coli</i>-Stämme.....	20
3.2 Bakterienreferenzstämme.....	25
3.3 Oligonukleotide.....	26
3.4 Zelllinie: IPEC-J2-Zellen	29
3.5 Nähr- und Selektivnährmedien	29
3.6 Lösungen und Puffer	31
3.7 Enzyme	32
3.8 Größenmarker	33

3.9	Farbstoffe	33
3.10	Verbrauchsmaterialien	33
3.11	Verwendete Geräte	34
3.12	Chemikalien	35
4.	METHODEN	36
4.1	Mikrobiologische Methoden	36
4.1.1	Probennahme	36
4.1.2	Anzucht der Bakterien.....	36
4.1.3	Konservierung der <i>E. coli</i> -Stämme	37
4.1.4	Biochemische Differenzierung der coliformen Kolonien.....	37
4.1.5	Hämolyseverhalten.....	38
4.1.6	Beweglichkeit.....	38
4.1.7	Prüfung des Kohlenhydratstoffwechsels	39
4.2	Molekularbiologische Methoden	40
4.2.1	Isolierung chromosomaler DNA	40
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
4.2.2.1	PCR nach Casey und Bosworth	41
4.2.2.2	PCR nach Clermont et al.....	42
4.2.2.3	PCR nach Ewers et al.....	43
4.2.2.4	PCR nach Müller et al.....	44
4.2.2.5	PCR zum Nachweis von <i>paa</i> , <i>aidA-I</i> und <i>sepA</i> [28].....	45
4.2.2.6	RAPD (<i>random amplified polymorphic DNA</i>) -PCR.....	46
4.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	46
4.2.4	Pulsfeld-Gelelektrophorese	47
4.3	Zellbiologische Methoden	49
4.3.1	Zellkultur	49
4.3.2	Adhäsionstest	49
4.4	Fluoreszenzmikroskopie	50
4.4.1	FAS-Test	50
4.4.2	DNA-Färbung und Eindecken der Präparate.....	51
4.5	Begriffsbestimmungen	51
4.6	Statistische Methoden	52
5.	ERGEBNISSE	54
5.1	Untersuchungen zur Diversität	54
5.1.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese/RAPD-PCR.....	54
5.1.2	Diversitätsindex.....	55
5.1.3	Virulenzgenprofil	57
5.1.4	Phylogenetische Zuordnung (ECoR-PCR).....	57
5.2	Geno- und phänotypische Charakterisierung von 102 <i>E. coli</i>-Isolaten aus dem Darm von Wildschweinen	58
5.2.1	Ausschluss identischer <i>E. coli</i> -Isolate durch Makrorestriktionsanalyse.....	58
5.2.2	Biochemische Identifizierung.....	59
5.2.3	Phylogenetische Zuordnung der <i>E. coli</i> nach Clermont et al. (ECoR-PCR)	60
5.2.4	Lebensraum, Alter und Geschlecht der Wildschweine.....	61
5.2.4.1	Herkunft der Wildschweine	61
5.2.4.2	Alter der Wildschweine	62
5.2.4.3	Geschlecht der Wildschweine.....	63
5.2.5	Hämolyse und Beweglichkeit der isolierten <i>E. coli</i> -Stämme	64
5.2.6	Vorkommen von Virulenzgenen (VGs) und virulenzassoziierten Genen (VAGs).....	65

5.2.6.1	Virulenzgene intestinal-pathogener <i>E. coli</i>	65
5.2.6.2	ExPEC-typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs)	68
5.2.7	Adhäsionsverhalten von <i>E. coli</i> aus dem Darm von Wild- und Hausschweinen.....	75
5.2.8	Kohlenhydratverwertung von <i>E. coli</i> aus dem Darm von Wild- und Hausschweinen	79
6.	DISKUSSION	82
6.1	Untersuchungen zur Diversität	83
6.1.1	Das Virulenzgenprofil im Zusammenhang mit der Besiedlung des Darms.....	86
6.1.2	Der Zusammenhang zwischen der phylogenetischen Gruppe und der Kolonisation bestimmter ökologischer Nischen	87
6.2	Geno- und phänotypische Charakterisierung der 102 <i>E. coli</i>-Stämme von Wildschweinen	88
6.2.1	Die Verteilung der phylogenetischen Gruppen	88
6.2.1.1	Die phylogenetische Gruppe und das Virulenzgenprofil	89
6.2.1.2	Die phylogenetische Gruppe und die Kolonisation sowie die Persistenz im GIT.....	90
6.2.1.3	Vergleich der phylogenetischen Verteilung bei <i>E. coli</i> von Wild- und Hausschweinen	91
6.2.2	Der Nachweis von Virulenzgenen und die damit verbundene Pathogenität.....	92
6.2.3	ExPEC-typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs).....	95
6.2.3.1	Vergleichendes Vorkommen der Adhäsingene.....	97
6.2.3.2	Vergleichendes Vorkommen der Eisenakquirierungsgene	97
6.2.3.3	Vergleichendes Vorkommen der Toxingene	99
6.2.3.4	Vergleichendes Vorkommen der Gene für die Serumresistenz	100
6.2.3.5	Vergleichendes Vorkommen der Gene für die Invasion.....	101
6.2.3.6	Korrelationen zwischen der phylogenetischen Gruppe B2 und VAGs	102
6.2.4	Das Adhäsionsvermögen kommensaler <i>E. coli</i> von Wild- und Hausschweinen	102
6.2.4.1	Das Adhäsionsvermögen von Wildschwein- <i>E. coli</i>	103
6.2.4.2	Vergleich des Adhäsionsvermögens von Wild- und Hausschwein- <i>E. coli</i>	104
6.2.5	Vergleich der Kohlenhydratverwertung mittels API 50 CH-System bei Wild- und Hausschwein- <i>E. coli</i>	105
7.	ZUSAMMENFASSUNG	107
8.	SUMMARY.....	108
	ANHANG.....	XIII
	ZITIERTE LITERATUR.....	XXVII
	DANKSAGUNG	XLIV
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XLV

Abbildungen

Abb. 1 Modell des reinen Kommensalismus nach Reilley et al. [168]	5
Abb. 2 Modell des Kommensalismus mit doppelter Substratlimitation nach Miura et al. [138].....	5
Abb. 3 Modell des Kommensalismus mit Substratkonkurrenz nach Miura et al. [138]	6
Abb. 4 Modell des Kommensalismus mit Kreuzinhibition nach Sheintuch et al. [191]	7
Abb. 5 Elektropherogramm zur Zuordnung von <i>E. coli</i> -Isolaten zu bestimmten Klonen.....	55
Abb. 6 Prozentualer Anteil der ECoR-Gruppen* im Jejunum, Ileum und Kolon der untersuchten Wildschweine	57
Abb. 7 Elektropherogramm zum Ausschluss identischer <i>E. coli</i> -Isolate aus dem Kolon verschiedener Wildschweine	59
Abb. 8 Prozentuale Verteilung der untersuchten 102 <i>E. coli</i> von 102 Wildschweinen auf die vier ECoR-Gruppen* A, B1, B2 und D	60
Abb. 9 Absolutverteilung des Vorkommens von 102 porzinen intestinalen <i>E. coli</i> der vier ECoR-Gruppen hinsichtlich der Herkunftsregion der 102 Wildschweine	62
Abb. 10 Prozentuale Verteilung von 102 porzinen intestinalen <i>E. coli</i> -Stämme hinsichtlich ihrer Beweglichkeit auf Weichagarplatten.....	65
Abb. 11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Aktinfärbung (Farbstoff: FITC-Phalloidin) von IPEC-J2-Zellen, die mit dem <i>E. coli</i> IMT 16467 infiziert wurden	67
Abb. 12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DNA-Färbung (Farbstoff: Propidiumiodid) von IPEC-J2-Zellen, die mit dem <i>E. coli</i> IMT 16467 infiziert wurden	67
Abb. 13 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Aktin- und DNA-Färbung (Farbstoffe: FITC-Phalloidin und Propidiumiodid) von IPEC-J2-Zellen, die mit <i>E. coli</i> IMT 16467 infiziert wurden	68
Abb. 14 Verteilung der virulenzassoziierten Gene (VAGs) innerhalb der 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i>	69
Abb. 15 Verteilung der virulenzassoziierten Gene (VAGs) von 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> innerhalb der ECoR-Gruppen	70
Abb. 16 Verteilung der für ExPEC-typischen Adhäsiogene bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> innerhalb der ECoR Gruppen.....	71
Abb. 17 Verteilung der für ExPEC-typischen Eisenakquirierungsgene bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> innerhalb der ECoR Gruppen	72
Abb. 18 Verteilung der für ExPEC-typischen Serumresistenzgene bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> innerhalb der ECoR Gruppen.....	73
Abb. 19 Darstellung der Adhäsionsraten von 30 zufällig aus den 102 zur Verfügung stehenden Wildschwein- <i>E. coli</i> ausgewählten Stämmen an IPEC-J2-Zellen.....	77
Abb. 20 Darstellung der Adhäsionsraten von 30 Hausschwein- <i>E. coli</i> an IPEC-J2-Zellen.....	77

Abb. 21 Adhäsionsraten der 30 zufällig ausgewählten <i>E. coli</i> von Wildschweinen und der 30 <i>E. coli</i> von Hausschweinen an IPEC-J2-Zellen.....	78
Abb. 22 D-Tagatoseverwertung im api 50 CH – System bei 35 zufällig ausgewählten <i>E. coli</i> von Wildschweinen und 30 <i>E. coli</i> von Hausschweinen.....	81
Abb. 23 Dulcitolverwertung im api 50 CH – System bei 35 zufällig ausgewählten <i>E. coli</i> von Wildschweinen und 30 <i>E. coli</i> von Hausschweinen.....	81

Tabellen

Tab. 1	Mögliche Wechselbeziehungen zwischen zwei Populationen nach Tischler et al. [207].....	2
Tab. 2	Klinisches Bild hervorgerufen durch Infektionen mit verschiedenen <i>E. coli</i> -Pathotypen	18
Tab. 3	Pathotypen intestinal-pathogener <i>E. coli</i> nach Nataro & Kaper (1998).....	18
Tab. 4	<i>E. coli</i> -Stämme aus der Fäzes von Wildschweinen.....	20
Tab. 5	<i>E. coli</i> -Stämme aus dem Darm von Ferkeln (Berlin Dahlem)	23
Tab. 6	<i>E. coli</i> -Stämme aus dem Rektum von Hausschweinen	23
Tab. 7	In der vorliegenden Arbeit verwendete Referenzstämme	25
Tab. 8	In der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer.....	26
Tab. 9	Substrate des api 50 CH – Systems (BioMérieux, Deutschland GmbH)	39
Tab. 10	Übersicht über die in vier Multiplex-PCR-Untersuchungen nachweisbaren VAGs	43
Tab. 11	Anzahl der Klone und Diversitätsindizes der <i>E. coli</i> -Populationen von 21 Wildschweinen.....	56
Tab. 12	„Bunte Reihe“ ausgewählter <i>E. coli</i> -Stämme.....	60
Tab. 13	102 intestinale <i>E. coli</i> -Isolate und Angaben zu Herkunft, Geschlecht und Alter der jeweiligen Wildschweine.....	63
Tab. 14	18 porcine intestinale <i>E. coli</i> -Stämme, die mehr als ein Virulenzgen aufwiesen	66
Tab. 15	Auflistung der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> nachgewiesenen, für ExPEC-typischen, virulenzassoziierten Gene (VAGs)	68
Tab. 16	Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Adhäsiogene	70
Tab. 17	Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Eisenakquirierungsgene	71
Tab. 18	Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Serumresistenzgene	72
Tab. 19	Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Toxingene	73
Tab. 20	Übersicht über die bei 102 untersuchten, intestinalen <i>E. coli</i> nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene (VAGs), die mit den ECoR-Gruppen statistisch signifikant korreliert waren.....	75
Tab. 21	Adhäsionsraten von 30 <i>E. coli</i> von Wildschweinen, die zufällig aus den insgesamt 102 zur Verfügung stehenden <i>E. coli</i> ausgewählt wurden und von 30 <i>E. coli</i> von Hausschweinen.....	76
Tab. 22	Durchschnittliche Adhäsionsraten an IPEC-J2-Zellen von <i>E. coli</i> der Gruppen I bis III.....	78

Tab. 23 Übersicht über die im api 50 CH – System unterschiedlich verwerteten Kohlenhydrate.....	80
Tab. 24 Vergleichendes Vorkommen von virulenzassoziierten Genen (VAGs), die für extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i> (ExPEC) typisch sind.....	96
Tab. 25 Phänotypische Merkmale der 102 untersuchten <i>E. coli</i> -Isolate von Wildschweinen.....	XIII
Tab. 26 Virulenzgene der 102 untersuchten <i>E. coli</i> -Isolate von Wildschweinen.....	XVI
Tab. 27 Für extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i> typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs): Adhäsion- und Eisenakquirierungsgene	XIX
Tab. 28 Für extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i> typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs): Gene für Serumresistenz, Toxine und Invasine	XXII
Tab. 29 Ergebnisse der Kohlenhydratverwertung von 35 Wildschwein- <i>E. coli</i> , die zufällig aus den untersuchten 102 <i>E. coli</i> ausgewählt wurden	XXV
Tab. 30 Ergebnisse der Kohlenhydratverwertung von 30 Hausschwein- <i>E. coli</i>	XXVI

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser (<i>aqua bidestillata</i>)
A/E	<i>Attaching and Effacing</i>
aEPEC	atypische enteropathogene <i>E. coli</i>
A.-Kl.	Altersklasse
APEC	aviär-pathogene <i>E. coli</i>
Bd.	Band
bes.	besonders
BFA	Bundesforschungsanstalt
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (<i>brain heart infusion broth</i>)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFB	<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i>
CFU	koloniebildende Einheit (<i>colony-forming unit(s)</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
D	Deutschland
DAEC	diffus adhärente <i>E. coli</i>
Di	Diversität
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dr.	Doktor
EAggEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
ECoR	<i>Escherichia coli</i> Referenzsammlung (<i>Escherichia coli Reference Collection</i>)
ED	Ödemkrankheit (<i>edema disease</i>)
EDEC	Ödemkrankheit-verursachende <i>E. coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
evtl.	eventuell
ExPEC	extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i>
f	folgende (Seite)
ff	folgende (Seiten)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FU	Freie Universität
g	Gramm
gedr.	gedruckt
ggr.	geringgradig
GIT	Gastrointestinaltrakt
griech.	griechisch
Hrsg.	Herausgeber
hgr.	hochgradig
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin
InPEC	intestinal-pathogene <i>E. coli</i>
IPEC-J2	<i>Intestinal Porcine Epithelial Cells-Jejunum 2</i>
k. A.	keine Angabe
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	<i>lysogeny broth</i>
LIM	Lysin-Indol-Beweglichkeit (<i>Lysine-Indole-Motility</i>)
M	Molar
MAX	Maximum
med.	medizinisch
mgr.	mittelgradig
min	Minute(n)

MIN	Minimum
Mio	Million(en)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (Anzahl Bakterien/Wirtszelle)
M.-Po	Mecklenburg-Vorpommern
n	Anzahl
ND	Neugeborenenendiarrhoe (<i>newborn diarrhea</i>)
NMEC	mit neonataler Meningitis-assoziierte <i>E. coli</i> (<i>neonatal meningitis E. coli</i>)
Nr.	Nummer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda=600$ nm
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion(en) (<i>polymerase chain reaction(s)</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
pmol	picomol
Prof.	Professor
P.	<i>Pseudomonas</i>
PWD	mit dem Absetzen-assoziierte Diarrhoe (<i>postweaning diarrhea</i>)
Reg.-Nr.	Registriernummer
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (<i>short chain fatty acids</i>)
s. o.	siehe oben
spp.	<i>species</i>
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>E. coli</i>
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tet	Tetrazyklin
Thür.	Thüringen
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
u. a.	unter anderem
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
USA	<i>United States of America</i>
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
v. a.	vor allem
VAG	virulenzassoziiertes Gen
VAGs	virulenzassoziierte Gene
VG	Virulenzgen
VGs	Virulenzgene
zahlr.	zahlreich
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1. Einleitung

Escherichia coli (*E. coli*) ist Bestandteil der autochthonen intestinalen Mikroflora des Schweins. Das Bakterium besiedelt als dominanter Aerobier den Gastrointestinaltrakt distal des Magens und trägt als Teil der kommensalen gastrointestinalen Mikroflora zur Aufrechterhaltung des mikrobiellen Gleichgewichts bei.

Im Gegensatz zu den umfassend typisierten und gut untersuchten bedeutendsten Durchfallerregern des Schweins wie enterotoxische (ETEC), enteropathogene (EPEC) und die Ödemkrankheit verursachende *E. coli* (EDEC) ist über die kommensale coliforme Mikroflora des Schweins bedeutend weniger bekannt. Im Darm von klinisch gesunden Hausschweinen konnte eine sehr diverse, dynamische und für jedes Hausschwein individuelle *E. coli*-Mikroflora nachgewiesen werden [186]. Einige der isolierten *E. coli* wiesen die für schweinepathogene *E. coli* typischen Virulenzgene oder die für extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC) charakteristischen virulenzassoziierten Gene auf [63, 184, 220]. ExPEC-spezifische Gene, die z. B. mit der Eisenaufnahme oder der Adhäsion assoziiert sind, sollen bei der Besiedlung des Darms eine wichtige Rolle spielen [186]. Außerdem wurden *E. coli* isoliert, die eine Vielzahl an Resistenzgenen aufwiesen. Im Gegensatz zu *E. coli* aus dem Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) wurden *E. coli* aus dem Wildschwein (*Sus scrofa scrofa*) bisher kaum untersucht [10, 62].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig Daten über die coliforme Mikroflora des Wildschweins zu erheben, grundlegende Kenntnisse über die Diversität von *E. coli*-Populationen zu erlangen und das natürliche Vorkommen von Virulenz- und Kolonisationsgenen bei *E. coli* in vom Menschen weitestgehend unbeeinflussten Schweinepopulationen zu untersuchen. In der modernen Schweinehaltung, die auf einer extrem kontrollierten und abgeschirmten Tierhaltung beruht, werden Hausschweine meist in altersspezifischen Gruppen auf Teil- oder Vollspaltenböden unter festgelegten Klimabedingungen (Luftfeuchte 70 %, Temperatur 12 bis 16°C) bei definierter Futter- und Arzneimittelgabe gehalten. Das europäische Wildschwein (*Sus scrofa scrofa*) hingegen lebt frei innerhalb von Laub- und Mischwäldern in Rotten zusammen und ernährt sich omnivor von Gräsern und Früchten, aber auch von Insekten und Kleinsäugetieren. Wildschweine unterscheiden sich damit von Hausschweinen grundlegend in der Altersstruktur, dem Sozialgefüge, der Ernährung und dem Lebensraum – Faktoren, die einen gesicherten Einfluss auf die Darmmikroflora haben [55, 67, 76]. Ob diese unterschiedlichen Lebensweisen auch zur Selektion einer anderen *E. coli*-Population geführt haben, soll diese Arbeit klären.

2. Schrifttum

2.1 Interspezifische Wechselbeziehungen

Zwei verschiedene Arten können, wie aus Tab. 1 ersichtlich wird, in den unterschiedlichsten Wechselbeziehungen zueinander stehen. Bereits 1879 wurde von de Bary [13] „das Zusammenleben verschiedener Organismen“ als Symbiose (griech. *syn/sym* = zusammen, *bios* = Leben) bezeichnet. Auch andere Autoren definieren lang andauernde Interaktionen zweier oder mehrerer Organismen verschiedener Arten als Symbiose, die entweder fakultativ oder obligat sein kann [122, 128, 144]. Laut dieser Definition würden alle parasitären, kommensalen und mutualistischen Beziehungen zu den symbiotischen Lebensweisen zählen. Insbesondere im europäischen Sprachraum hat sich jedoch die Ansicht etabliert, dass unter Symbiose im engeren Sinn nur die Beziehungen gehören, die für beide Organismen von Vorteil sind [36, 64, 93]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Begriff Symbiose daher im engeren Sinn gebraucht.

Allgemein spricht man, ungeachtet positiver, negativer oder neutraler Auswirkungen, von Wechselbeziehungen zwischen Populationen unterschiedlicher Arten. [81, 90]. Eine Übersicht über mögliche Wechselbeziehungen bietet nachfolgende Tabelle.

Tab. 1 Mögliche Wechselbeziehungen zwischen zwei Populationen nach Tischler et al. [207]

Wechselbeziehung	Auswirkung auf Population 1	Auswirkung auf Population 2
Symbiose	positiv	positiv
Kommensalismus	positiv	neutral
Prädation/Parasitismus	positiv	negativ
Neutralismus	neutral	neutral
Amensalismus	neutral	negativ
Kompetition	negativ	negativ

2.1.1 Symbiose

Nach Görtz et al. [81] gibt es drei Ausprägungsformen der Symbiose: den Mutualismus, die Eusymbiose und die Allianz. Diese Formen unterscheiden sich hauptsächlich in der Lebensnotwendigkeit der symbiotischen Beziehung für einen oder beide Partner. Demzufolge werden mehr oder weniger regelmäßige Beziehungen zwischen zwei verschiedenen Arten, die für beide Teile vorteilhaft und Existenz erleichternd, aber nicht lebensnotwendig sind, als Mutualismus (lat. *mutuus* = Gegenseitigkeit) bezeichnet [9, 32, 216].

Darüber hinaus definieren Tischler et al. die Eusymbiose (griech. *eu* = wahr, *bios* = Leben) als das „Zusammenleben verschiedener Arten, bei dem Stoffwechsel- und Nahrungsprodukte des einen Partners für den anderen lebensnotwendig sind, oder doch so vorteilhaft geworden sind, dass sich beide physiologisch ergänzen“ [207].

Den Gegensatz dazu bildet die Allianz/ Protokooperation, eine besonders lockere Beziehung zweier Arten, die allen zum Vorteil gereicht, wobei aber beide Arten getrennt voneinander problemlos lebensfähig sind (fakultative Symbiose) [218]. Unabhängig davon werden Endosymbionten, die innerhalb eines Wirtes leben und Ektosymbionten, die auf dem Wirt siedeln, unterschieden.

2.1.2 Kommensalismus

Der Kommensalismus (lat. *commensalis* = Tischgenosse) wird synonym mit der Bezeichnung Probiose (griech. *pro* = für, griech. *bios* = Leben) genutzt. Der Begriff wurde 1876 von dem belgischen Zoologen Pierre Joseph van Beneden geprägt [211]. Im engeren Sinne bezeichnet er lediglich das Mitessertum eines Kommensalen, der den Wirt durch seine Anwesenheit nicht schädigt, sondern nur von dessen Nahrungsüberschuss profitiert [81, 192, 216]. Im weiteren Sinne bezieht sich der Begriff des Kommensalismus auf alle Formen des Zusammenlebens, die den Kommensalen begünstigen und dem Wirt zwar nicht nutzen, ihm aber auch nicht schaden [9, 122, 149]. Einer der beiden Partner, der Kommensale, profitiert also von der Präsenz oder Aktivität des weder geschädigten noch geförderten Wirts [37, 93, 200].

Schwierig hingegen gestaltet sich die genaue Abgrenzung zur Symbiose [122]. Holler et al. sprechen in diesem Sinn von einem fließenden Übergang zwischen Symbiose und Kommensalismus [90]. Ähnlich wie die Symbiose kann der Kommensalismus fakultativ (temporär) oder obligat sein. Darüber hinaus lässt sich der Kommensalismus im weiteren Sinn weitergehend unterteilen: der vorübergehende (Phoresie) oder permanente (Synphorismus) Transport des Kommensalen durch den Wirt, die Siedlung des Kommensalen in der Wohnstätte des Wirts (Synökie), das nachbarliche Wohnen (Parökie) oder das Siedeln auf (Epökie) bzw. in (Entökie) dem Wirtskörper [207].

2.1.3 Prädation/ Parasitismus

Wechselbeziehungen, die einen Partner begünstigen, während der andere benachteiligt wird, werden in Parasitismus und Prädation unterteilt [59, 149]. Eine Interaktion von Organismen zweier verschiedener Arten, bei der der eine, meist kleinere Organismus (Parasit) in oder auf

dem anderen Organismus (Wirt) lebt und von diesem Nahrung erhält, nennt man, sofern sie den Wirtsorganismus benachteiligt, Parasitismus oder Schmarotzertum [64, 128, 139, 149]. Der Wirt muss durch den Parasiten nicht schwer geschädigt werden; er wäre aber ohne Parasit leistungsfähiger.

Unter Prädation hingegen werden alle Räuber-Beute-Beziehungen zwischen zwei verschiedenen Arten zusammengefasst. Eine Population (Prädator) nutzt die andere, meist kleinere als Nahrung [128, 139, 180].

2.1.4 Neutralismus/Koexistenz

Wenn zwei Organismen verschiedener Arten interagieren, ohne sich in ihrem Stoffwechsel oder ihrer Aktivität gegenseitig zu beeinflussen, spricht man von Neutralismus [3, 59, 128]. Die Wechselbeziehung bleibt durchweg ohne Einfluss auf die Fitness beider Organismen, d.h. auf den relativen Beitrag jedes Organismus zur Nachkommenschaft der Population [133]. Reiner Neutralismus kommt jedoch selten bzw. gar nicht vor, da Konkurrenzsituationen bei Besiedlung des gleichen Habitats kaum ausgeschlossen werden können. Meist findet der Begriff Anwendung bei Situationen, wo interspezifische Reaktionen nur in geringem und unbedeutenden Maße auftreten.

2.1.5 Amensalismus

Mit Amensalismus (griech. *a* = nicht, lat. *mensa* = Tisch) wird das Zusammenleben zweier Partner bezeichnet, bei dem der eine Partner einen negativen Einfluss auf den anderen Partner ausübt, selbst aber weder Vor- noch Nachteile hat [15, 59, 128, 149].

2.1.6 Competition/Konkurrenz

Unter interspezifischer Competition/Konkurrenz versteht man den Wettstreit zweier verschiedener Arten um Anzahl, Menge und Qualität in eingeschränktem Maße vorhandener Ressourcen, wie Lebensraum, Energie- und Kohlenhydratquellen, Elektronenakzeptoren sowie Wachstumsfaktoren [59, 128, 139, 149]. Sie umfasst die Interferenz (Hemmung) und die Exploitation (Ausbeutung). Die Interferenz ist der behinderte Zugang eines der Konkurrenten zu einer Ressource, die er für das Wachstum oder Überleben benötigt, wohingegen bei der Exploitation beide Konkurrenten um eine begrenzte Ressource wettstreiten [113].

2.2 Modelle des Kommensalismus

Zur weitergehenden Differenzierung des Kommensalismus im engeren Sinne werden vorhandene und nutzbare Substrate zusätzlich zur Kommensal-Wirtsbeziehung betrachtet. Es lassen sich nach Boucher et al. die im Folgenden aufgeführten Modelle unterscheiden [32].

2.2.1 Reiner Kommensalismus

Laut Definition von Reilly et al. nutzt ein kommensaler Organismus die Produkte eines anderen Organismus zum Wachsen, ohne ihn zu beeinträchtigen [168]. Das Modell des reinen Kommensalismus geht davon aus, dass einer der beteiligten Organismen (M_A) aus einem Substrat (S_1), das vom kommensalen Organismus (M_B) benötigte Produkt (P_1) herstellt [37, 191, 200]. Diese Form des reinen Kommensalismus wird auch als Kommensalismus mit einseitiger Substratlimitation bezeichnet, da M_B nur von dem von M_A hergestellten Produkt P_1 abhängig ist (Abb. 1). Ein Abfall von S_1 würde zu einem monotonen Abfall aller anderen beteiligten Komponenten führen, bis wieder ein stabiler Zustand erreicht ist. Ein Beispiel für den reinen Kommensalismus erläuterten Megee et al. [135]: *Lactobacillus caseii* benötigt zum Wachstum Riboflavin, welches von *Saccharomyces cerevisiae* sezerniert wird.

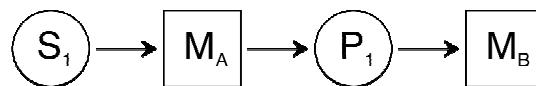


Abb. 1 Modell des reinen Kommensalismus nach Reilly et al. [168]

Miura et al. ergänzten dieses Modell durch eine zusätzliche Abhängigkeit des kommensalen Organismus von dem Substrat S_2 [138]. Daher spricht man bei dieser Form von einem Kommensalismus mit doppelter Substratlimitation (Abb. 2). Beide Formen zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus. Mögliche Konsequenzen dieses Systems sind (I) sowohl M_A als auch M_B koexistieren, (II) nur M_A überlebt oder (III) keiner überlebt (vollständiger Mangel an S_1) [32].



Abb. 2 Modell des Kommensalismus mit doppelter Substratlimitation nach Miura et al. [138]

2.2.2 Kommensalismus mit Substratkonkurrenz

In diesem Modell ist M_B – der Kommensale – abhängig von dem durch M_A aus Substrat S_1 erzeugten Produkt P_1 und Substrat S_2 . Zusätzlich zu dieser kommensalen Beziehung konkurrieren jedoch beide Organismen um S_1 , das kompetitiv assimiliert wird (Abb. 3). Dies führt zu stärkeren Schwankungen im System, wenn S_1 nicht im Überschuss vorhanden ist. Miura et al. beschrieben eine derartige kommensale Beziehung zwischen *Pseudomonas oleovorans* and *Mycotorula japonica* [138]. *P. oleovorans* assimiliert Phenol und scheidet Biotin aus. *M. japonica* hingegen benötigt als Wachstumsfaktor das ausgeschiedene Biotin, aber ebenso wie *P. oleovorans* Phenol als Kohlenhydratquelle. Um die Assimilation des Phenols konkurrieren also beide Spezies, während gleichzeitig eine kommensale Beziehung vorliegt.

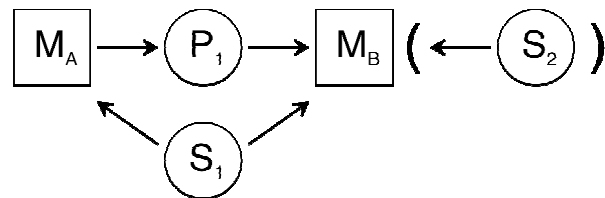


Abb. 3 Modell des Kommensalismus mit Substratkonkurrenz nach Miura et al. [138]

2.2.3 Kommensalismus mit Kreuzinhibition

Unter Kreuzinhibition versteht man die Hemmung der Wachstumsrate innerhalb eines (kommensalen) Systems durch dort gebildete chemische Substanzen. Ursachen können Enzym-Inhibitor-Komplexe oder eine durch vermehrte Säureproduktion bedingte pH-Wertabsenkung sein. Der Organismus M_A stellt aus dem Substrat S_1 das Produkt P_1 her, das der Organismus M_B nutzt, um das Produkt P_2 zu generieren. Falls es sich bei P_2 um eine Säure handelt, führt dies zu einer Ansäuerung des umgebenden Milieus. Reagieren M_A und/oder M_B sensibel auf eine pH-Wertabsenkung, kann es zu einer Wachstumsstagnation oder aber dem Absterben eines oder beider Organismen kommen. Ähnlich verhält es sich, wenn das von M_B hergestellte Produkt P_2 einen Inhibitor für M_A darstellt. Dieser würde das Wachstum/die Aktivität von M_A hemmen (Abb. 4). Bedingt durch das geringere Vorkommen von P_1 könnte M_B weniger Inhibitor herstellen, was wiederum die Aktivität von M_A steigern würde. Ein Beispiel hierfür geben Sheintuch et al. [191]. Ammoniak wird durch *Nitrosomonas spp.* zunächst zu Nitrit oxidiert und anschließend von *Nitrobacter spp.* in Nitrat

umgewandelt. Dieser reine Kommensalismus wird durch eine Kreuzinhibition ergänzt, da das Wachstum von *Nitrobacter spp.* durch Nitrat-Ionen gehemmt wird.

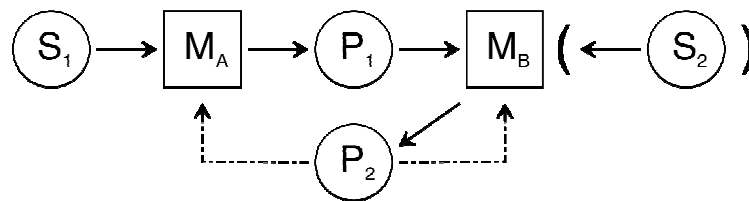


Abb. 4 Modell des Kommensalismus mit Kreuzinhibition nach Sheintuch et al. [191]

2.3 Mikrobielle Darmflora

Man geht davon aus, dass der menschliche Organismus aus etwa 10^{13} menschlichen eukaryotischen Zellen besteht, wohingegen die Oberfläche des menschlichen Körpers einschließlich des Magen-Darm-Kanals von etwa 10^{14} prokaryotischen und eukaryotischen Zellen mikrobiellen Ursprungs besiedelt ist [93, 176], zu denen außer den quantitativ dominierenden Bakterien auch Protozoen, anaerobe Pilze und Bakteriophagen zählen [226]. Diese werden unter dem Begriff Mikroflora zusammengefasst. Der Darmtrakt von Warmblütern mit seinen spezifischen Eigenschaften, also bestimmten abiotischen Faktoren wie der Temperatur, dem pH-Wert, den Fließgeschwindigkeiten, dem Redoxpotential und den in der Digesta enthaltenen Nährstoffen wird von einer komplexen und dynamischen Mikroflora bewohnt [35, 91]. Diese funktionelle Einheit aus dem Biotop, also dem Darmtrakt einschließlich der abiotischen Faktoren, und der Biozönose, also der Gesamtheit der gastrointestinalen Mikroflora, bildet ein Ökosystem [34]. Dieses wird im Folgenden als Gastrointestinaltrakt (GIT) bezeichnet. Der GIT ist nach Hooper et al. von allen Ökosystemen das am dichtesten besiedelste [92]. Es sind 400 bis 500 verschiedene Bakterienspezies gezählt worden [7, 87, 193, 201], von denen die obligat anaeroben Bakterien 100 bis 1000 Mal häufiger als obligate Aerobier und fakultative Anaerobier vertreten sind. Allerdings setzen sich 99 % aller Mikroorganismen im Darm aus lediglich 30 bis 40 verschiedenen Spezies zusammen [93].

2.3.1 Die gastrointestinale Mikroflora

Laut Dubos et al. besteht die indigene, d.h. die eingeborene Mikroflora des Darms aus der autochthonen Mikroflora, die bereits während der Evolution der Wirtsspezies präsent war, der normalen Mikroflora, also Mikroorganismen, die ubiquitär in der Gesellschaft vorkommen

und den wahren Pathogenen, die zufällig erworben wurden und im Darm persistieren können [53].

Weiterhin unterteilte er die Mikroflora in zwei Gruppen. Einerseits gäbe es Bakterienpopulationen, deren Wachstumsraten plötzlich stark anstiegen, nach einigen Tagen ein Maximum erreichten, aber auch ebenso schnell wieder abfielen und fast verschwänden. Als Beispiele nannte er Flavobakterien, Enterokokken und *Escherichia coli*. Im Gegensatz dazu bilden zum Beispiel Laktobazillen, anaerobe Streptokokken und *Bacteroides* schon vor dem Absetzen/Entwöhnen Populationen, die auf einem konstanten Level das ganze Leben des Wirts hindurch Bestand haben. Diese wurden von Dubos et al. als autochthone Mikroflora bezeichnet. Der erstgenannten Gruppe – die mit stark schwankenden Populationsleveln assoziierten Bakterien – wurde eine potentielle Pathogenität unterstellt, da die Antwort des Immunsystems zu einer direkten Eliminierung bzw. Reduzierung der entsprechenden Bakterienspezies führt.

Eine alternative Definition boten Savage et al.: Ein mikrobielles Ökosystem stellt einen Komplex aus Mikroorganismen in einer vorgegebenen Umgebung und Umweltfaktoren dar, mit denen es assoziiert ist [176]. Dieses Ökosystem bietet Habitate und Nischen, die zunächst in unberührtem Zustand von autochthonen/indigenen Mikroorganismen kolonisiert werden [130]. Der Begriff Nische beschreibt, welche abiotischen und biotischen Bedingungen und Umweltfaktoren für das Wachstum, das Überleben und die Reproduktion der Mikroorganismen notwendig sind [58, 93, 130, 139, 176]. Unter Kolonisation versteht man die Etablierung einer Bakterienpopulation auf der Haut oder den Schleimhäuten, ohne in das Gewebe einzudringen [14, 83, 110]. Eine Reduktion der Bakterienpopulation wird hierbei durch die entsprechende Reproduktionsrate ausgeglichen und nicht durch den Influx neuer Bakterien [130].

Allochthone/nichtindigene Mikroorganismen hingegen können zwar in jedem Habitat gefunden werden, sind aber nicht charakteristisch für dieses Habitat und stellen gerade im Darm bei hohen Fließgeschwindigkeiten nur transiente, d.h. den Darm ohne beständige Kolonisation passierende Mikroorganismen dar, die nur wenige Tage bis Wochen im Darm nachweisbar sind [18, 176]. Diese können jedoch Habitate besiedeln, die von autochthonen Spezies aufgrund einer Störung des Ökosystems verlassen wurden [35]. Der entscheidende Unterschied zwischen beiden Formen ist die native Besiedlung des Habitats durch autochthone Spezies, wohingegen allochthone Mikroorganismen sich dort nur unter abnormen Bedingungen ansiedeln bzw. vermehren können [130]. Folgende Kriterien gelten für autochthone, gastrointestinale Mikroorganismen: anaerobes Wachstum (fakultativ oder

obligat), ständige Nachweisbarkeit in gesunden Wirten, nur partielle Besiedlung des Verdauungstrakts, Kolonisation infolge der sukzessiven Besiedlung des heranwachsenden Organismus kurz nach der Geburt, stabile Populationslevel im ausgewachsenen Organismus und enge Assoziation mit dem Mukosa-Epithel [53, 176].

Gerade im Dickdarm kommen sowohl autochthone als auch allochthone Mikroorganismen vor. Die Unterscheidung beider erweist sich häufig als schwierig. Viele der dort gefundenen allochthonen Mikroorganismen sind transiente Bakterien aus der Nahrung oder losgelöste Mikroorganismen aus weiter proximal gelegenen Habitaten [178]. Mikroorganismen können außerdem in einem bestimmten Habitat autochthon sein, d.h. dieses nativ besiedelt haben, dann aber infolge peristaltischer Darmbewegungen oder aber durch eine Verdrängung aus ihrem angestammten Habitat aufgrund geänderter Umgebungsbedingungen mit dem Darminhalt zusammen in weiter distal gelegene Darmregionen gelangen, wo sie zur allochthonen Darmmikroflora gehören [176].

2.3.2 Bakterielle Populationsgruppen und Habitate im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren

Die im menschlichen GIT vorkommenden Mikroorganismen stammen aus den drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya*. Doch obwohl der Verdauungstrakt von allen Ökosystemen mit Mikroorganismen am dichtesten besiedelt ist, stammen die im Darm vorkommenden Bakterien nur aus 8 der 55 bekannten bakteriellen Abteilungen [94]. Diese acht Abteilungen sind *Spirochaetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *VadinBE9 7*, *Verrucomicrobi*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), *Firmicutes* und *Proteobacteria*. Vertreter der fünf erst genannten Abteilungen kommen nur selten vor. Die drei Hauptabteilungen sind die CFB, die *Firmicutes* und die *Proteobacteria* [9]. Im Gegensatz zum GIT weist das Erdreich nach Bäckhed et al. eine Besiedlung von bis zu 20 verschiedenen Abteilungen auf [9]. Der geringen Diversität auf dem Abteilungslevel steht eine hohe Diversität auf dem Spezies- und Subspezieslevel gegenüber. So konnten aus humaner Fäzes mehr als 400 verschiedene Bakterienspezies isoliert werden [7, 65]. Allerdings ist eine große Anzahl der im Darm vorkommenden Mikroorganismen mit den klassischen Methoden nicht kultivierbar [53, 87, 226]. Erst seit einigen Jahren werden kultivierungsunabhängige Verfahren – wie die Analyse ribosomaler DNA-Sequenzen – eingesetzt, um mehr über intestinale, mikrobielle Lebensgemeinschaften zu erfahren [22, 202, 226].

Der Darm aus anatomischer Sicht bietet den Mikroorganismen viele verschiedene Habitate und Nischen. Falk et al. sprachen davon, dass sich im Laufe der Evolution die anatomischen

Strukturen des Darms sowie die physiologischen Bedürfnisse des Wirts an die gastrointestinale Mikroflora angepasst haben und auf diese Weise unterschiedliche, gut definierte anatomische Regionen geschaffen wurden [48, 91, 130]. Daher besiedeln die Mikroorganismen den Darmtrakt auch nicht zufällig, sondern man findet charakteristische Populationen in bestimmten Teilen des Verdauungskanals [18, 130].

Habitate, die ähnliche Lebensbedingungen bieten, lassen sich von proximal nach distal in die Mund- oder Maulhöhle, den Magen mit proximalem Dünndarm, den distalen Dünndarm und den Dickdarm gliedern.

Allein in der Mund-/Maulhöhle können bis zu 500 verschiedene Spezies aus neun bakteriellen Abteilungen und einem *Archaea*-Stamm nachgewiesen werden [48, 158]. Der Speichel verfügt mit 10^9 Bakterien/ml über ein recht hohes Vorkommen an Mikroorganismen. Dabei handelt es sich größtenteils um transiente Bakterien, die von den Schleimhäuten der Zunge und der Wangen sowie vom Zahnbelag stammen und mit dem Speichel weiter nach distal gelangen [18]. Zum überwiegenden Anteil sind in der Mund-/Maulhöhle Streptokokken vorhanden [1]. Im Magen und proximalen Dünndarm werden, bedingt durch den niedrigen pH-Wert und die hohe Durchflussgeschwindigkeit, pro Gramm Inhalt nur noch 10^3 - 10^5 Bakterien gefunden [7, 18, 130]. Mithilfe der 16S rRNA-Analyse konnten bis zu 128 unterschiedliche Spezies aus acht Abteilungen nachgewiesen werden. Es dominieren säuretolerante Laktobazillen und Streptokokken [52, 53, 132]. Im Duodenum und Jejunum treten zusätzlich Bifidobakterien auf und im distalen Dünndarmbereich steigt die Anzahl der Bakterien auf Werte von 10^8 /g Darminhalt bei gleichzeitiger Erhöhung der Speziesdiversität [197]. Bedingt durch die geringe Durchflussgeschwindigkeit und ein niedriges Redoxpotential stellt der Dickdarm mit 10^{10} - 10^{11} Bakterien/g Darminhalt den „Hauptwohnsitz“ der Bakterien im GIT dar [130]. Verstärkt treten im Zäkum *Bacteroides* und Clostridien auf, die im Kolon zusammen mit den Eubakterien die dominierenden Spezies bilden [48, 176]. Unabhängig vom Abschnitt des Verdauungskanals wurden von Berg et al. vier weitere Mikrohabitate unterschieden: das intestinale Lumen, die unbewegliche Mukusschicht auf den Epithelzellen, die tiefe Mukusschicht der intestinalen Krypten sowie die Oberfläche der Epithelzellen [18].

2.3.3 Die Mikroflora im porzinen Gastrointestinaltrakt

Auch im GIT des Schweins findet man ein diverses und dynamisches Ökosystem mit bis zu 400 verschiedenen Bakterienspezies vor [163]. Im Vergleich zu anderen Tierarten weisen Schweine sowohl im Magen als auch im distalen Dünndarm eine recht hohe Anzahl an Bakterien auf [166]. Leser et al. untersuchten mittels 16S rDNA-Sequenzanalysen den Inhalt

von Ileum, Zäkum und Kolon von 12 bis 18 Wochen alten Schweinen und fanden 375 unterschiedliche Phylotypen vor [121].

Während im Magen und proximalen Dünndarmbereich aufgrund des niedrigen pH-Werts und der hohen Passageraten hauptsächlich säuretolerante, an die Epitheloberfläche adhärierte Laktobazillen, aber auch *Enterobacteriaceae* und Streptokokken in Raten von 10^3 - 10^5 CFU/g Mageninhalt nachweisbar sind [18, 130], nehmen im distalen Dünndarmbereich sowohl die Anzahl der Bakterien als auch die Diversität zu [128]. Die herabgesetzte Passagerate, der höhere pH-Wert und das niedrigere Oxidations-Reduktions-Potential ermöglichen das Ansiedeln weiterer Bakterienspezies [7, 18].

Den Hauptort der bakteriellen Fermentation stellen das Zäkum und das Kolon dar. Die hohe Substratverfügbarkeit, der neutrale pH-Wert und die verlangsamte Durchflussrate ermöglichen Populationsdichten von bis zu 10^{11} CFU/g Koloninhalt [18, 142, 176]. Die bakterielle Fermentation der Kohlenhydrate vor allem im Kolon führt zu einer hohen Konzentration an flüchtigen Fettsäuren, die zu 15 bis 18 % zur Versorgung des Schweins beitragen [6].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im GIT des Schweins die Gram-positive Mikroflora überwiegt [96, 121, 142]. Zu den am häufigsten vorkommenden Bakterien zählen Laktobazillen, Clostridien, Eubakterien, Fusobakterien, Peptostreptokokken, *Bacteroides*, *Acetivibrio* und *Selenomonas* [121, 174]. *Bacteroides spp.* bilden den größten Anteil der Gram-negativen Darmmikroflora [169].

2.4 Interaktionen zwischen Wirt und gastrointestinaler

Mikroflora

Symbiotische und kommensale interspezifische Wechselbeziehungen richten sich nach Hooper et al. vor allem auf metabolische Ressourcen, die es einem oder beiden Partnern ermöglichen, andernfalls nicht verfügbare Nährstoffe zu nutzen [93].

Zwischen der Gesamtheit der indigenen Mikroflora des GIT und dem Wirtsorganismus existiert eine erfolgreiche und für beide Seiten vorteilhafte, daher symbiotische Wechselbeziehung. Den Mikroorganismen bietet der Darm des Wirtsorganismus ein sicheres Habitat mit stabilen Temperaturen und pH-Werten [176]. Die für den Wirt unverdaulichen Nahrungsbestandteile, aber auch abgelöste Darmepithelzellen, von den Becherzellen produzierter Mukus und die sezernierten gastrointestinalen Enzyme stellen wichtige Substrate für den bakteriellen Energiestoffwechsel zur Verfügung [26, 131].

Andererseits wird nach Barbara et al. die Besiedlung des GIT durch die Mikroflora aufgrund des Verdauungsgeschehens erschwert [11]. Zum einen können in der Ingesta enthaltene Mikroorganismen durch die Magen- und Darmmotilität nach distal transportiert und wieder ausgeschieden werden. Zum anderen bietet die Mukusschicht auf den Darmepithelzellen nicht nur eine Substratquelle, sondern erschwert die Adhäsion der gastrointestinalen Mikroorganismen an die Rezeptoren des Epithels.

Ist das Ökosystem des GIT ungestört, besteht ein ökologisches Gleichgewicht zwischen der Darmmikroflora und dem Wirt, das sowohl von den Wechselbeziehungen zwischen Wirt und der gastrointestinalen Mikroflora als auch von denen der Bakterien untereinander beeinflusst wird [7].

2.4.1 Positive Effekte der mikrobiellen Darmflora auf den Wirtsorganismus

Die positiven Wirkungen der Darmbakterien lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Einerseits unterstützt die Darmmikroflora den Stoffwechsel des Wirts durch Bereitstellung von Nährstoffen und Vitaminen [2], andererseits erfüllt sie einige wichtige Schutzmechanismen im GIT.

Stoffwechsellleistungen: Die gastrointestinale Mikroflora ist in der Lage, teils bedingt durch die Vielfalt der Spezies, unverdauliche Nahrungsbestandteile wie Pflanzenzellwände (Cellulosen, Hemicellulosen, Pektine, 1-3,1-4- β -Glucane, Arabinoxylane, Inulin) und unverdauliche Stärke zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA = *short chain fatty acids*) oder Laktat zu verstoffwechseln, die dem Wirt teilweise zur Absorption über die Darmschleimhaut zur Verfügung stehen [9, 27, 131, 194]. So decken die Kolonepithelzellen 70 % ihres Energiebedarfs durch die Oxidation von Butyrat. Nach Hooper et al. reduziert sich im Gegensatz zu keimfrei aufgezogenen Tieren die Kalorienzufuhr konventionell gehaltener Tiere um 30 % [93].

Außerdem produzieren unter anderem *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* und Fusobakterien Vitamin K, Vitamin B12, Pantothenensäure, Nicotinsäureamid und Folsäure [132]. Eine weitere wichtige Funktion stellt die Konjugation von Gallensäuren dar [27]. Primäre Gallensäuren werden zur Fettverdauung vom Wirt in den Dünndarm sezerniert und müssen danach aktiv im Ileum resorbiert werden. Eine Resorption im Kolon ist nicht mehr möglich, es sei denn, die primären Gallensäuren wurden zuvor von der gastrointestinalen Mikroflora dekonjugiert. In dieser Form können sie auch im Kolon resorbiert und dem enterohepatischen Kreislauf zugeführt werden.

Schutzmechanismen: Zu den protektiven Funktionen der kommensalen Darmbakterien zählen die Kolonisationsresistenz, die Förderung der Proliferation des Darmepithels, die Stimulation der Darmperistaltik durch freie Fettsäuren und die Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems [18]. An der Kolonisationsresistenz sind nach Autenrieth verschiedene Mechanismen beteiligt [7]. In erster Linie dient die physiologische Darmmikroflora als Barriere gegen die Ansiedlung pathogener Mikroorganismen. Indem viele Rezeptoren und Bindungsstellen an den Darmepithelzellen bereits von der autochthonen Mikroflora besetzt sind, können pathogene Bakterien nach Savage et al. und Tancrede et al. nicht adhären [176, 204]. Außerdem produzieren Teile der kommensalen Mikroflora Metabolite oder Bakteriozine, die toxisch auf andere (pathogene) Bakterien wirken [173]. Unabhängig davon kommt es zwischen den autochthonen und den transienten, eventuell pathogenen Mikroorganismen zu einer Konkurrenz um Substrate, Vitamine und Wachstumsfaktoren. Als vierten Mechanismus nannte Autenrieth die Zerstörung bakterieller Toxine durch die indigene Darmmikroflora [7]. So konnten Castagliuolo et al. bei *in vitro*-Versuchen zeigen, dass eine aus *Saccharomyces boulardii* extrahierte Protease das Toxin A von *Clostridium difficile* blockierte [39].

Keimfrei aufgezogene Mäuse weisen im Gegensatz zu konventionell geborenen Tieren Unterschiede in der Ausbildung des Darmepithels auf. Die Wand des Dünndarms von keimfrei aufgezogenen Tieren wiegt im Vergleich zum Körpergewicht weniger, enthält weniger Wasser und die Ausbildung der *Lamina propria* ist stark reduziert [80]. Gordon et al. berichteten von einer um 30 % reduzierten Oberfläche der Dünndarmmukosa [80]. Savage et al. schilderten, dass der Transit von Darmepithelzellen von den Lieberkühn'schen Krypten bis zur Zottenspitze in keimfrei aufgezogenen Mäusen 151 Stunden dauert, in Mäusen mit assoziierter Darmmikroflora hingegen nur 53 Stunden [177]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Beeinflussung der Entwicklung und der Funktion des darmassoziierten Immunsystems [40, 43, 134]. Shanahan et al. beschrieben bei keimfrei aufgezogenen Tieren eine höhere Anfälligkeit für intestinale Infektionen, kleinere Peyer'sche Platten und weniger intraepitheliale Lymphozyten [190]. O'Hara et al. zeigten im Zellversuch, dass eine Infektion mit den kommensalen Bakterien *Bacillus infantus* und *Lactobacillus salivarius* zur Sekretion von Interleukin-10 und dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α durch myeloide dendritische Zellen führt, eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* hingegen zu einer Expression des Nuclearfaktors (NF)- κ B und Interleukins-8 [154]. Das Immunsystem ist also in der Lage, zwischen der kommensalen Darmmikroflora einerseits und bestimmten pathogenen Mikroorganismen andererseits zu unterscheiden [131].

2.4.2 Negative Effekte der mikrobiellen Darmflora auf den Wirtsorganismus

Zu den schädigenden Auswirkungen der kommensalen Darmbakterien auf den Wirtsorganismus gehören nach Berg et al. die Bildung karzinogener Substanzen, das bakterielle Fehlbesiedlungssyndrom, die vermehrte Translokation von Darmbakterien, die Beteiligung an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie eine verminderte Fettabsorption durch die Dekonjugation von Gallensäuren [18].

Gorbach et al. beschrieben, dass die gastrointestinalen Mikroorganismen durch Umwandlung diätetischer, nichtkarzinogener Substanzen (Glycoside, Azofarbstoffe, Amino- und Gallensäuren) in Präkarzinogene oder Karzinogene zur Entstehung von Dickdarmkrebs beitragen können [73, 88]. Inwieweit diese jedoch wirklich ursächlich für den Krebs sind, ist ungeklärt.

Wenn das Gleichgewicht des Ökosystems gestört ist, kann es zu einem Fehlbesiedlungssyndrom (*bacterial overgrowth*) kommen [64]. Mögliche Ursachen für ein gestörtes Ökosystem sind oral, aber auch systemisch verabreichte Antibiotika, Nahrungsumstellungen bei Reisen, eine generelle Fehlernährung, verschiedene Virusinfektionen des GIT, die Schocksymptomatik oder eine verletzungsbedingte Durchlässigkeit der Darmbarriere, aber auch ein durch Immunsuppressiva oder Krankheiten geschwächtes Immunsystem [17, 70]. Die bakterielle Überwucherung kann mit einer erhöhten Translokation indigener Darmbakterien einhergehen, insbesondere von *Enterobacteriaceae*, die als opportunistische Pathogene extraintestinale Erkrankungen bis hin zur Sepsis hervorrufen können.

Auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie der *Colitis ulcerosa* oder dem Morbus Crohn ist die indigene Darmmikroflora, auf die das Immunsystem des Wirts mit einer überschießenden Antwort reagiert, involviert. Cong et al. zeigten, dass CD4-positive T-Zellen von C3H/HeJBir-Mäusen, die spontan eine Colitis entwickeln, deutlich mit der Produktion von Interleukin-2 und Interferon- γ auf Antigene der indigenen Darmbakterien reagierten, nicht jedoch auf Antigene in der Nahrung oder aus dem Darmepithel [46]. Ein weiterer Aspekt ist die unter 2.4.1 angesprochene Dekonjugation von Gallensäuren. Geschieht diese bereits in der Nähe des Sekretionsorts, ergibt sich daraus im Dünndarm eine verminderte Fettabsorption bis hin zu Steatorrhoe [203].

2.4.3 Mikrobielle Interaktionen

Die Wechselbeziehungen der gastrointestinalen Mikroflora sind hoch komplex und können sowohl symbiotischer, neutraler als auch kompetitiver Natur sein [18, 48].

Interspezifische Kooperationen kommen vor allem bei der Hydrolyse komplexer Kohlenhydrate vor. Wolin und Miller beschrieben, dass *Bacteroides spp.* Succinat als Intermediärprodukt produzieren, welches von Propionibakterien als Substrat genutzt und zu Propionat decarboxyliert werden kann [219]. Bifidobakterien hingegen sind in der Lage, Inulin und Stärke zu Laktat abzubauen, das von sekundär fermentierenden Bakterien zu Acetat und Propionat umgewandelt wird [188].

Gleichermaßen ist die Bereitstellung bzw. der Austausch von Wachstumsfaktoren ein Beispiel für mikrobiellen Mutualismus oder Kommensalismus. So stellt z. B. die Pantothersäure für Laktobazillen einen essentiellen Wachstumsfaktor dar [159, 164]. Sie wird häufig mit der Nahrung zugeführt, kann jedoch auch von vielen Mikroorganismen – darunter *E. coli* – synthetisiert werden [127].

Bakterielle Interferenz- und Konkurrenzmechanismen äußern sich in der Erschöpfung essentieller Substanzen (Substrate, Vitamine), in der Änderung der Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Redoxpotential) und der Produktion antagonistischer Substanzen [215]. Gemäß der Nischenkonstruktionstheorie, nach welcher Organismen einige der Umgebungsbedingungen, die im erwählten Habitat vorherrschen, zu ihren Gunsten modifizieren können, sind Mikroorganismen in der Lage, durch Stoffwechselprozesse das chemische Milieu ihres Habitats zu beeinflussen und damit ihre Umgebung, z. B. infolge einer Veränderung des pH-Werts oder des Redoxpotentials so zu verändern, dass sie von anderen Spezies nur schwer besiedelt werden kann [47]. Eine weitere schädigende Relation stellt die Bildung antagonistischer Substanzen wie Bakteriozine, toxische Metabolite, Antibiotika, freie Fettsäuren, Ammoniak und Hydrogenperoxid dar. Bohnhoff et al. wiesen nach, dass SCFA bzw. von *Bacteroides spp.* gebildetes Acetat und Butyrat die Vermehrung von *Salmonella spp.* behindern [29].

2.5 Die Entwicklung der Darmmikroflora beim Schwein

Der Verdauungskanal eines normal entwickelten Fetus ist bis zur Geburt steril [18, 130, 155]. Die erste Aufnahme von Mikroorganismen findet noch während des natürlichen Geburtsvorganges durch Kontakt mit der maternalen Vaginalschleimhaut und der Umwelt statt [52, 91, 205]. Daher sind die unbesiedelten Habitate des gastrointestinalen Ökosystems

zunächst diversen Mikroorganismen ausgesetzt, wobei viele dieser Mikroorganismen die vorhandenen Habitate nicht besiedeln können und bald nach der Geburt nicht mehr nachweisbar sind [176]. Andere Mikroorganismen hingegen siedeln sich in den vorhandenen Habitaten an und setzen damit die schrittweise Kolonisation der verschiedenen Habitate durch die indigene/autochthone Mikroflora in Gang. Die ersten Bakterien sind bereits binnen weniger Stunden nach der Geburt im Kot nachweisbar und bereits eine Woche später können bis zu 10^{10} CFU/g Kot auftreten [21, 176, 182].

Mit dem Platzen der Fruchtblasen beginnt auch bei ungeborenen Ferkeln die Besiedlung des Darms mit Mikroorganismen, die von der Sau und aus der Umwelt stammen [130, 163, 166]. Die direkte Übertragung von Mikroorganismen zwischen Mutter und Neugeborenem wurde sowohl für den Menschen als auch für das Tier beschrieben [129, 176, 186, 205]. Beim Schwein sind hierfür mögliche Ursache die Koprophagie der Ferkel und der Kontakt zum Muttertier beim Saugen [97, 112, 166]. Durch die sukzessive Kolonisation des GIT mit Mikroorganismen wird aus dem unbesiedelten Magendarmsystem eines ungeborenen Ferkels ein hochdiverses und komplexes Ökosystem [96, 112].

Innerhalb von drei Stunden *post partum* besiedeln aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien den GIT des Ferkels, darunter am häufigsten *E. coli*, Streptokokken und Laktobazillen [112, 166]. Konstantinov et al. fanden durch eine 16S rRNA basierte Untersuchung bei zwei Tage alten Ferkeln *Lactobacillus sobrius* und *Lactobacillus reuteri* als vorherrschende Spezies im Darm vor [112].

Insbesondere die coliforme Mikroflora senkt das Redoxpotential so weit ab, dass bereits zwei Tage nach der Geburt über 90 % der nachweisbaren Mikroflora aus strikten Anaerobiern besteht [163]. Schon am fünften Lebenstag findet man eine diverse und komplexe Mikroflora, die sich hauptsächlich aus Laktobazillen, Streptokokken, *Clostridien*, *Bacteroides*, *Eubacterium* und Bifidobakterien zusammensetzt [166].

Das Absetzen führt infolge der ungewohnten Nahrungsbeschaffenheit und des Verlustes des Muttertiers stressbedingt zu einer reduzierten Futteraufnahme [114, 166]. Durch die qualitative und quantitative Futterumstellung wird die Zusammensetzung der Mikroflora instabiler und weniger divers. Nach Restabilisierung des intestinalen Ökosystems ist dieses charakteristisch für jedes Individuum [96, 225].

2.6 *Escherichia coli*

2.6.1 Das Bakterium *Escherichia coli*

Escherichia coli wurde 1919 nach seinem Entdecker Theodor Escherich, der es 1885 isolierte und als *Bacterium coli communale* bezeichnete, *Escherichia coli* benannt. Es gehört zum Stamm der *Proteobacteria*, zur Klasse der *Gammaproteobacteria*, zur Ordnung der *Enterobacteriales* und zur Familie der *Enterobacteriaceae*, zu der gegenwärtig mehr als 50 Gattungen mit mehr als 200 Arten gezählt werden. Die Gattung *Escherichia* besteht neben *E. coli* u. a. aus den Arten *E. albertii*, *E. blattae* und *E. fergusonii*. *E. coli* ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes, peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium mit einer Größe von 2 µm x 0,5 µm [85]. Es ist gewöhnlich ein harmloser und häufiger Bestandteil der indigenen/autochthonen Darmmikroflora von Menschen, von Säugetieren sowie zu einem geringeren Anteil auch von Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen [76, 189, 197, 199]. Bei gesunden Menschen und Säugetieren stellt es den am häufigsten vorkommenden fakultativen Anaerobier im Kolon dar [51, 148]. Der untere Teil des Darmtrakts, also der distale Anteil des Ileums und das Kolon der meisten Warmblüter bilden das Primärhabitat von *E. coli* [52, 85], hierbei hauptsächlich der Mukuslayer des Kolons [108]. Hartley et al. fanden in der Kolonmukosa von Menschen *E. coli*-Level von etwa 10⁶ CFU/g Mukosagewebe [86]. Schierack et al. hingegen konnten nur in vier von dreißig Mukusproben mehr als 10³ *E. coli*/g Mukosagewebe beim Schwein nachweisen [185].

2.6.2 Pathogene *E. coli*

Zur indigenen Darmmikroflora gehörende, kommensale *E. coli* sind meist harmlose, den Wirtsorganismus nicht schädigende Mitglieder der gastrointestinalen Mikroflora [108, 170, 189, 199].

Als opportunistische Pathogene können sie jedoch bei Verletzungen der Darmmukosa oder immunsupprimierten Wirten klinisch apparente Infektionen verursachen. Durch den Erwerb spezifischer Virulenzattribute wie Invasivität, Toxinproduktion oder auch Phagozytoseresistenz können viele *E. coli*-Stämme als obligate Pathogene das Immunsystem des Wirtes überwinden und dabei Krankheiten auslösen oder aber durch Toxinsekretion die Epithelzellen schädigen. Russo und Johnson unterschieden daher kommensale, intestinal-pathogene (InPEC) und extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC) [170]. ExPEC verursachen

keine intestinalen Erkrankungen [198], können aber den Darmtrakt asymptomatisch kolonisieren [103].

Tab. 2 Klinisches Bild hervorgerufen durch Infektionen mit verschiedenen *E. coli*-Pathotypen nach Johnsson und Russo 2002 [103]

Pathotypen	klinische Manifestation*		
	Asymptomatische intestinale Kolonisation	Diarrhoe	Extraintestinale Infektion
Kommensale <i>E. coli</i>	+++	—	+
Intestinal-pathogene <i>E. coli</i>	—	+++	—
Extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i>	+++	—	+++

* klinische Manifestation auf semiquantitativer Skala von — (nicht vorhanden) bis +++ (maximal) dargestellt

Intestinal-pathogene *E. coli* können durch den Nachweis verschiedener Virulenzgene in sechs Pathotypen unterteilt werden: enterotoxische (ETEC), Shiga-Toxin produzierende/enterohämorrhagische (STEC/EHEC), enteropathogene (EPEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAaggEC) und diffus adhärente (DAEC) *E. coli*.

Tab. 3 stellt die mit den verschiedenen *E. coli*-Pathotypen assoziierten Virulenzfaktoren und Krankheiten dar [148].

Tab. 3 Pathotypen intestinal-pathogener *E. coli* nach Nataro und Kaper (1998)

Pathotyp	Virulenzfaktoren	Krankheiten
ETEC	Hitzelabile und hitzestabile Enterotoxine (LT, ST)	Wässrige Diarrhoe bei Kindern, Reisediarrhoe, Jungtierdiarrhoe
STEC/EHEC	Shiga-Toxine (Stx1, Stx2) <i>Locus of Enterocyte Effacement</i> Hitzestabiles Toxin (<i>astA</i>) Enterohämolysine Adhäsine (Intimin) Plasmid pO175	Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), Hämorrhagische Colitis (HC), Blutige Diarrhoe beim Tier, Ödemkrankheit beim Schwein
EPEC	<i>Locus of Enterocyte Effacement bundle forming pili (bfp)</i> , außer bei atypischen EPEC	Diarrhoe bei Kindern in Entwicklungsländern
EIEC	Enterotoxine 140-MDa Plasmid	wässrige Diarrhoe
EAaggEC	Adhäsine Hitzestabiles Toxin (<i>astA</i>) Cytotoxine	sekretorische Diarrhoe
DAEC	Fimbrien (F1845) 100-kDa <i>outer membrane protein</i> (OMP)	wässrige Diarrhoe

2.6.3 *E. coli* im porzinen Gastrointestinaltrakt

E. coli kommen im GIT des Schweins hauptsächlich im Dickdarm, aber auch häufig im Dünndarm vor [50]. Sie zählen neben Streptokokken, Laktobazillen und Clostridien zu den Erstbesiedlern des zunächst sterilen Verdauungskanal des neugeborenen Ferkels [109] und werden über die Umwelt und das Muttertier aufgenommen. Samson et al. berichteten von einer Koprophagie des Sauenkots durch die Ferkel [175]. Allerdings wiesen Katouli et al. [109] und Schierack et al. [186] bei Ferkeln andere *E. coli*-Isolate als bei Sauen nach. Sie beschrieben außerdem, dass für jedes Ferkel schon in der ersten Lebenswoche eine einzigartige *E. coli*-Mikroflora nachweisbar ist und sich auch mit zunehmendem Alter kaum Ähnlichkeiten ergeben, so dass jedes Ferkel nach dem Absetzen eine eigene charakteristische *E. coli*-Mikroflora besitzt [89]. Die *E. coli*-Populationen sind hoch dynamisch und individuell [89, 109, 186]. Hinton et al. wiesen bis zu 25 verschiedene *E. coli*-Klone im Darm von Schweinen nach [89], Schierack et al. fanden bis zu 41 Klone [185]. Die Diversität, berechnet nach dem Simpson's Index [95] lag im Kolon höher als im Jejunum. Aus dem Darm von Ferkeln isolierten Schierack et al. über einen Zeitraum von acht Wochen 44 unterschiedliche *E. coli*-Klone, von denen die Mehrzahl so genannte *minor clones* darstellten, die nur in geringer Zahl für eine kurze Zeit auftraten und danach nicht mehr nachweisbar waren [186]. Die Assoziation bestimmter *E. coli*-Phylotypen zu spezifischen Darmregionen, wie sie von Dixit et al. aufgezeigt wurde [50], konnten Schierack et al. nicht bestätigen [185].

3. Material

3.1 Herkunft der verwendeten *E. coli*-Stämme

Die untersuchten *E. coli*-Stämme stammen aus dem Darm von 119 Wildschweinen aus den Bundesländern Berlin, Brandenburg, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern, die während verschiedener Jagden in den Jahren 2006 bis 2008 erlegt wurden. Es handelte sich dabei um verhaltensunauffällige Tiere, deren *post mortem* Untersuchung keinen Grund zur Beanstandung gab. Das Alter wurde aufgrund der Zahnentwicklung geschätzt.

Die 119 Wildschweine setzen sich auf folgende Weise zusammen: In den Jahren 2006 und 2007 wurden aus dem Jejunum, Ileum und Kolon von 63 Wildschweinen *E. coli*-Isolate gewonnen. Zusätzlich wurden in der Jagdsaison 2007/2008 von weiteren 56 erlegten Wildschweinen Kotproben aus dem Rektum entnommen.

Für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit – die Diversitätsbestimmung der *E. coli*-Isolate aus Wildschweinen – wurden von 21 Wildschweinen je 30 *E. coli*-Isolate verwendet, von denen jeweils zehn aus dem Jejunum, dem Ileum und dem Kolon stammen.

Für den zweiten Teil der Arbeit – die geno- und phänotypische Charakterisierung von *E. coli*-Stämmen aus Wildschweinen – wurde pro Wildschwein ein entweder aus dem Kolon oder dem Rektum stammendes *E. coli*-Isolat für weitergehende Untersuchungen genutzt. Nach Isolation der *E. coli*-Stämme und Ausschluss identischer Isolate standen die in Tab. 4 aufgelisteten *E. coli*-Stämme für diesen Teil der Arbeit zur Verfügung.

Tab. 4 *E. coli*-Stämme aus der Fäzes von Wildschweinen

IMT-Nummer	Jagdort	Datum der Jagd
14232	Ahrensfelde	19.11.2007
14233	Ahrensfelde	19.11.2007
14234	Ahrensfelde	19.11.2007
16421	Casel, Drebkau	10.11.2006
16422	Casel, Drebkau	10.11.2006
16423	Casel, Drebkau	10.11.2006
16424	Casel, Drebkau	10.11.2006
16425	Casel, Drebkau	10.11.2006
16426	Casel, Drebkau	11.11.2006
16461	Casel, Drebkau	08.11.2007
16462	Casel, Drebkau	08.11.2007
16463	Casel, Drebkau	08.11.2007
16464	Casel, Drebkau	08.11.2007
16465	Casel, Drebkau	08.11.2007

IMT-Nummer	Jagdort	Datum der Jagd
16466	Casel, Drebkau	08.11.2007
16492	Casel, Drebkau	18.01.2008
16493	Casel, Drebkau	18.01.2008
16494	Casel, Drebkau	18.01.2008
16495	Casel, Drebkau	18.01.2008
16496	Casel, Drebkau	18.01.2008
16497	Casel, Drebkau	18.01.2008
16498	Casel, Drebkau	18.01.2008
16499	Casel, Drebkau	18.01.2008
16500	Casel, Drebkau	18.01.2008
16501	Casel, Drebkau	18.01.2008
16472	Grunewald	13.12.2007
16473	Grunewald	13.12.2007
16474	Grunewald	13.12.2007
16475	Grunewald	13.12.2007
16476	Grunewald	13.12.2007
16477	Grunewald	13.12.2007
16478	Grunewald	13.12.2007
16479	Grunewald	13.12.2007
16480	Grunewald	13.12.2007
16481	Grunewald	13.12.2007
16412	Groß Liebitz	11.11.2006
13127	Groß Liebitz	11.11.2006
16414	Groß Liebitz	11.11.2006
13122	Groß Liebitz	11.11.2006
16415	Groß Liebitz	11.11.2006
13100	Groß Liebitz	11.11.2006
16419	Groß Liebitz	03.11.2006
16420	Groß Liebitz	03.11.2006
16437	Jüterbog	01.12.2006
16438	Jüterbog	01.12.2006
16439	Jüterbog	01.12.2006
16440	Jüterbog	01.12.2006
16468	Lauchhammer	29.11.2007
16469	Lauchhammer	29.11.2007
16470	Lauchhammer	29.11.2007
16471	Lauchhammer	29.11.2007
16467	Milstrich	20.11.2007
16460	Netzeband	10.11.2007
16427	Nochten	11.11.2006
16428	Nochten	11.11.2006
16429	Nochten	11.11.2006
16430	Nochten	11.11.2006
16431	Nochten	11.11.2006
13109	Oranienburg	22.11.2006
16416	Oranienburg	22.11.2006
16417	Oranienburg	22.11.2006
16418	Oranienburg	30.10.2006
16459	Schaalsee	09.11.2007
16489	Schwarzkollm	15.12.2007
16490	Schwarzkollm	15.12.2007
16491	Schwarzkollm	15.12.2007
16441	Sollschwitz	09.12.2006

IMT-Nummer	Jagdort	Datum der Jagd
16442	Sollschwitz	09.12.2006
16443	Sollschwitz	09.12.2006
16444	Sollschwitz	09.12.2006
16445	Sollschwitz	09.12.2006
16446	Sollschwitz	09.12.2006
16447	Sollschwitz	09.12.2006
16448	Sollschwitz	09.12.2006
16449	Sollschwitz	09.12.2006
16450	Sollschwitz	09.12.2006
16451	Sollschwitz	09.12.2006
16452	Sollschwitz	09.12.2006
16453	Sollschwitz	09.12.2006
16454	Sollschwitz	09.12.2006
16455	Sollschwitz	09.12.2006
16456	Sollschwitz	09.12.2006
16457	Sollschwitz	09.12.2006
16458	Sollschwitz	09.12.2006
16488	Spreetal	08.12.2007
16502	Spreetal	15.12.2008
16432	Vollenborn	25.11.2006
16433	Vollenborn	25.11.2006
16434	Vollenborn	25.11.2006
16435	Vollenborn	25.11.2006
16436	Vollenborn	25.11.2006
14227	Vollenborn	27.11.2007
14228	Vollenborn	27.11.2007
14229	Vollenborn	27.11.2007
14230	Vollenborn	27.11.2007
14231	Vollenborn	27.11.2007
16482	Welzow	01.12.2007
16483	Welzow	01.12.2007
16484	Welzow	01.12.2007
16485	Welzow	01.12.2007
16486	Welzow	01.12.2007
16487	Welzow	01.12.2007

Zum Vergleich der Daten von *E. coli* aus Wildschweinen mit denen aus Hausschweinen wurden *E. coli* verwendet, die aus dem Darm von Ferkeln (Tab. 5) bzw. aus dem Rektum von Sauen aus Ferkelerzeugerbetrieben (Tab. 6) stammen. Die in Tab. 5 aufgelisteten *E. coli*-Isolate wurden im Zuge der Untersuchungen des DFG-Projektes FOR 438 des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin (Reg.-Nr. Tierversuch: G0037/02) isoliert. Sie stammen aus 35 Tage alten Ferkeln, die durch Kreuzung der Hausschweinrassen Deutsche Landrasse und Duroc erzeugt wurden. Die in Tab. 6 aufgeführten *E. coli*-Stämme wurden 2008 aus Kottupfern von sieben Monate bis fünf Jahre alten konventionell gehaltenen Hausschweinen (ebenfalls Hybride der Hausschweinrassen Deutsche Landrasse und Duroc) gewonnen.

Tab. 5 *E. coli*-Stämme aus dem Darm von Ferkeln (Berlin Dahlem)

IMT-Nummer	Entnahmestelle	Entnahmedatum
18156	Kolon	09.08.2004
18157	Kolon	12.08.2004
18158	Jejunum	12.08.2004
18159	Kolon	13.08.2004
18160	Kolon	13.08.2004
18161	Kolon	13.08.2004
18162	Kolon	13.08.2004
18163	Kolon	13.08.2004
18164	Kolon	19.08.2004
18165	Kolon	19.08.2004
18166	Kolon	19.08.2004
18167	Kolon	19.08.2004
18168	Kolon	19.08.2004
18169	Kolon	20.08.2004
18170	Kolon	20.08.2004
18171	Kolon	20.08.2004
18172	Kolon	20.08.2004
18173	Kolon	20.08.2004
18174	Jejunum	20.08.2004
18175	Kolon	01.03.2005
18176	Kolon	01.03.2005
18177	Jejunum	09.05.2005
18178	Jejunum	09.05.2005
18179	Kolon	18.07.2005
18180	Kolon	18.07.2005
18181	Jejunum	18.07.2005
18182	Jejunum	22.08.2005
18183	Kolon	26.09.2005
18184	Kolon	26.09.2005
18185	Kolon	26.09.2005

Tab. 6 *E. coli*-Stämme aus dem Rektum von Hausschweinen

IMT-Nummer	Ort	Entnahmedatum
18186	Berlin Dahlem	30.10.08
18187	Berlin Dahlem	30.10.08
18188	Berlin Dahlem	30.10.08
18189	Berlin Dahlem	30.10.08
18190	Berlin Dahlem	30.10.08
18191	Berlin Dahlem	30.10.08
18192	Berlin Dahlem	30.10.08
18193	Berlin Dahlem	30.10.08
18194	Berlin Dahlem	30.10.08
18195	Berlin Dahlem	30.10.08
18196	Landkreis Harz	04.11.08
18197	Landkreis Harz	04.11.08
18198	Landkreis Harz	04.11.08
18199	Landkreis Harz	04.11.08
18200	Landkreis Harz	04.11.08
18201	Landkreis Harz	04.11.08
18202	Landkreis Harz	04.11.08
18203	Landkreis Harz	04.11.08

IMT-Nummer	Ort	Entnahmedatum
18204	Landkreis Harz	04.11.08
18205	Landkreis Harz	04.11.08
18206	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18207	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18208	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18209	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18210	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18211	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18212	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18213	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18214	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08
18215	Landkreis Teltow-Fläming	06.11.08

3.2 Bakterienreferenzstämme

Tab. 7 In der vorliegenden Arbeit verwendete Referenzstämme

IMT-Nummer	Stamm-Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Verwendung	Quelle	Referenz
5155	F1987/00-25	<i>E. coli</i> , O2:H5	Huhn	ExPEC-PCR	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven	Ewers et al., 2007
2470	IMT2470	APEC, O2:K1:H5, <i>astA</i> +	Huhn	ExPEC-PCR	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven	Ewers et al., 2007
7920	ECoR 64	<i>E. coli</i> , O75:NM	Mensch	ExPEC-PCR	NFSTC MSU	Ewers et al., 2007
1200	IMT1200	<i>E. coli</i>	Mensch	ExPEC-PCR	Inst. f. Hygiene und Infektionskrankheiten d. Tiere, Universität Gießen	Ewers et al., 2007
9267	BK 658	<i>E. coli</i> , O75:K1:H7, NMEC	Mensch	ExPEC-PCR	Inst. f. Molek. Infektionsbiologie, Universität Würzburg	Ewers et al., 2007
204	B41-1259	EPEC, O101:H-, <i>est-Ia</i> +, <i>fimF41</i> +	Rind	Bosworth-PCR	Inst. f. Hygiene und Infektionskrankheiten d. Tiere, Universität Gießen	Barth et al., 2007
19	E57 / E1000	EDEC, O138:K81, <i>fedA</i> +, <i>estII</i> +, <i>est-Ia</i> +	Schwein	Bosworth-PCR	Inst. f. Hygiene und Infektionskrankheiten d. Tiere, Universität Gießen	Barth et al., 2007
4830	IMT4830	<i>E. coli</i> , <i>faeG</i> +, <i>est-III</i> +, <i>eltB-lpt</i>	Schwein	Bosworth-PCR	IMT, FU-Berlin	Barth et al., 2007
10186	PB 0158	<i>E. coli</i> , <i>stx2e</i> +	Schwein	Bosworth-PCR	IMT, FU-Berlin	Barth et al., 2007
3838	IMT3838	<i>E. coli</i> , <i>fasA</i> +, <i>est-Ia</i> +	Unbekannt	Bosworth-PCR	Inst. f. Hygiene und Infektionskrankheiten d. Tiere, Universität Gießen	Barth et al., 2007
6609	E2348/69	EPEC, O127:H6, <i>eae</i> +, <i>bfpA</i> +, <i>perA</i> +	Mensch	PCR nach Müller	Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, TU Dresden	Müller et al., 2006
8206	Wh01/26/021-5	STEC, O149:H-NT, <i>StxI</i> +, <i>stx2</i> +, <i>eae</i> +, <i>hlyEHEC</i> +	Unbekannt	PCR nach Müller	Institut für Epidemiologie, BFAV Wusterhausen	Müller et al., 2006
16218	Nissle 1917	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (DSM 6601), probiotisch, O6:K5:H1	Mensch	ECoR-PCR, Adhäsionstest	Mutaflor®; Ardeypharm, Herdecke; Nissle, 1918	Barth et al., 2007; Kleta et al., 2006
1716	MG1655	<i>E. coli</i> K-12, OR:H48	Mensch	Adhäsionstest	C.A. Cross, San Francisco, USA	Schierack et al., 2006
2147	EDL933	<i>E. coli</i> , O157:H7, <i>stx2</i> +, <i>LEE</i> +, <i>hlyEHEC</i> +, <i>pssA/EspP</i> +, <i>stxI</i> +	Mensch	Pulsfeldgel-elektrophorese	Inst. f. Hygiene und Infektionskrankheiten d. Tiere, Universität Gießen	Johnson et al., 1995

3.3 Oligonukleotide

Die DNA-Sequenzen der Oligonukleotide (Primer) wurden aus Veröffentlichungen entnommen und von den Firmen Genosys (Steinheim) und Operon (Köln) bezogen.

Tab. 8 In der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer

Zielgen	Beschreibung	Primersequenz (5' – 3')	Referenz
<i>afa/dra</i>	<i>Afimbrial/ Dr antigen-specific adhesin</i>	I: TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG II: CCAGTAACTGTCCGTGACA	Ewers et al., 2007
<i>aidA-I</i>	<i>Adhesin involved in diffuse adherence</i>	I: ACAGTATCATATGGAGCCA II: TGTGCGCCAGAACTATTA	Boerlin et al., 2005
<i>astA</i>	<i>EAST1 (heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli)</i>	I: TGCCATCAACACAGTATATCC II: TAGGATCCTCAGGTCGCGAGT GACGGC	Yamamoto & Echeverria, 1996
<i>bfpB</i>	<i>Bundle forming pilus subunit B</i>	I: GATAAACTGATACTGGGCAGC II: AGTGACTGTTCGGGAAGCAC	Müller et al., 2006
<i>chuA</i>	<i>Heme receptor gene (E. coli haem utilization)</i>	I: GACGAACCAACGGTCAGGAT II: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	Clermont et al., 2000
<i>cnf1/2</i>	<i>Cytotoxic necrotising factor</i>	I: TCGTTATAAAATCAAACAGTG II: CTTTACAATATTGACATGCTG	Ewers et al., 2004
<i>crlA</i>	<i>Type 1 fimbriae (D-mannose specific adhesin)</i>	I: TTTTCGATTGTCTGGCTGTATG II: CTTTCAGATTCAGCGTCGTC	Maurer et al., 1998
<i>cvi/cva</i>	<i>Structural genes of colicin V operon (microcin ColV)</i>	I: TCCAAGCGGACCCCTTATAG II: CGCAGCATAGTTCCATGCT	Ewers et al., 2007
<i>eltB</i>	<i>Heat-labile enterotoxine LT-Ia and LT-Ib</i>	I: GGC GTTACTATCCTCTCTAT II: TGGTCTCGGTCAGATATGT	Bosworth & Casey, 1997
<i>escV</i>	<i>E. coli secreted protein V (LEE3)</i>	I: GGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG II: CCTTTTACAACTTCATCGCC	Müller et al., 2006
<i>est Ia</i>	<i>Heat-stable enterotoxin ST-Ia</i>	I: CAACTGAATCACTTGACTCTT II: TTAATAACATCCAGCACAGG	Bosworth & Casey, 1997
<i>est II</i>	<i>Heat-stable enterotoxin ST-II</i>	I: TGCCTATGCATCTACACAAT II: CTCCAGCAGTACCATCTCTA	Bosworth & Casey, 1997
<i>faeG</i>	<i>F4 fimbrial adhesin</i>	I: GAATCTGTCCGAGAATATCA II: GTTGGTACAGGTCTTAATGG	Bosworth & Casey, 1997
<i>fanA</i>	<i>F5 fimbrial adhesin</i>	I: AATACTTGTTTCAGGGAGAAA II: AACTTTGTGGTAACTTCCT	Bosworth & Casey, 1997
<i>fasA</i>	<i>F6 fimbrial adhesin</i>	I: AAGTTACTGCCAGTCTATGC II: GTA ACTCCACCGTTTGTATC	Bosworth & Casey, 1997
<i>fedA</i>	<i>F 18 fimbrial adhesin</i>	I: TGGTAACGTATCAGCAACTA II: ACTTACAGTGCTATTTCGACG	Bosworth & Casey, 1997
<i>feoB</i>	<i>Ferrous iron transporter B</i>	I: TGAGGACTCCGGCTATATGG II: ATA ACTGCCAGAATGCACACC	Boehnke
<i>fimC</i>	<i>Type 1 fimbriae (D-mannose-specific adhesin)</i>	I: GGGTAGAAAATGCCGATGGTG II: CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	Janßen et al., 2001
<i>fimF41a</i>	<i>F41 fimbrial adhesin</i>	I: AGTATCTGGTTCAGTGATGG II: CCACTATAAGAGGTTGAAGC	Bosworth & Casey, 1997

Zielgen	Beschreibung	Primersequenz (5' – 3')	Referenz
<i>fyuA</i>	<i>Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)</i>	I: GCGACGGGAAGCGATGACTTA II: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	Schubert et al., 1998
<i>gimB</i>	<i>Genetic island associated with newborn meningitis</i>	I: TCCAGATTGAGCATATCCC II: CCTGTAACATGTTGGCTTCA	Ewers et al., 2007
<i>hlyA</i>	<i>Haemolysin A</i>	I: GTCCATTGCCGATAAGTTT II: AAGTAATTTTGGCCGTGTTTT	Ewers et al., 2004
<i>hra</i>	<i>Heat-resistant agglutinin</i>	I: TCACTTGCAGACCAGCGTTTC II: GTAACACACTGCTGTCACCT	Ewers et al., 2007
<i>ibeA</i>	<i>Invasion of brain endothelium</i>	I: TGGAACCCGCTCGTAATATAC II: CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	Ewers et al., 2007
<i>iha</i>	<i>Iron-regulated-gene-homologue adhesin</i>	I: GCCAGATCGATGACCAC II: TAGTGC GTTGGGTTATCGCTC	Ewers et al., 2007
<i>ireA</i>	<i>Iron-responsive element (putative catecholate siderophore receptor)</i>	I: ATTGCCGTGATGTGTTCTGC II: CACGGATCACTTCAATGCGT	Ewers et al., 2007
<i>iroN</i>	<i>Catecholate siderophore (salmochelin) receptor</i>	I: ATCCTCTGGTCGCTAACTG II: CTGCACTGGAAGAACTGTTCT	Ewers et al., 2007
<i>irp2</i>	<i>Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)</i>	I: AAGGATTTCGCTGTTACCGGAC II: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	Schubert et al., 1998
<i>iss</i>	<i>Increased serum survival</i>	I: ATCACATAGGATTCTGCCG II: CAGCGGAGTATAGATGCCA	Ewers et al., 2005
<i>iucD</i>	<i>Aerobactin synthesis</i>	I: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC II: CCTGATCCAGATGATGCTC	Janßen et al., 2001
<i>kpsMTII</i>	<i>Group II capsule antigens</i>	I: GCGCATTTGCTGATACTGTTG II: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	Johnson & Stell, 2000
<i>malX</i>	<i>Pathogenicity-associated island marker CFT073</i>	I: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA II: TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	Johnson & Stell, 2000
<i>mat</i>	<i>Meningitis-associated and temperature-regulated fimbriae</i>	I: TATACGCTGGACTGAGTCGTG II: CAGGTAGCGTCGAACTGTA	Ewers et al., 2007
<i>neuC</i>	<i>K1 capsular polysaccharide</i>	I: GGTGGTACATTCCGGGATGTC II: AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	Watt et al., 2003
<i>ompA</i>	<i>Outer membrane proteine</i>	I: AGCTATCGCGATTGCAGTG II: GGTGTTGCCAGTAACCGG	Ewers et al., 2007
<i>paa</i>	<i>Porcine A/E-associated gene</i>	I: GGCCCGCATACAGCCTTG II: TCTGGTCAGGTCGTCAATACTC	Boerlin et al., 2005
<i>papC</i>	<i>Pilus associated with pyelonephritis</i>	I: TGATATCACGCAGTCAGTAGC II: CCGGCCATATTCACATAAC	Janßen et al., 2001
<i>pic</i>	<i>Serin protease autotransporter</i>	I: ACTGGATCTTAAGGCTCAGG II: TGGAATATCAGGGTGCCACT	Ewers et al., 2007
<i>RAPD 1</i>	<i>RAPD Primer 1</i>	GGTGCGGGAA	Schierack et al., 2009

Zielgen	Beschreibung	Primersequenz (5' – 3')	Referenz
<i>RAPD 2</i>	<i>RAPD Primer 2</i>	GTTTCGCTCC	Schierack et al., 2009
<i>RAPD 4</i>	<i>RAPD Primer 4</i>	AAGAGCCCGT	Schierack et al., 2009
<i>sat</i>	<i>Secreted autotransporter toxin</i>	I: TGCTGGCTCTGGAGGAAC II: TTGAACATTCAGAGTACCGGG	Ewers et al., 2007
<i>sepA</i>	<i>Secretion of E. coli proteins</i>	I: TAAAACCCGCCCTGAGTA II: TGCCGGTGAACAGGAGGTTT	Boerlin et al., 2005
<i>sfa/foc</i>	<i>S fimbriae (sialic acid-specific) and FIC fimbriae</i>	I: CGGAGAACTGGGTGCATCTTA II: GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA	Ewers et al., 2007
<i>sitD chromosomal</i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	I: ACTCCCATACACAGGATCTG II: CTGTCTGTGTCCGGAATGA	Ewers et al., 2007
<i>sitD episomal</i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	I: TTGAGAACGACAGCGACTTC II: CTATCGAGCAGGTGAGGA	Ewers et al., 2007
<i>stx1</i>	<i>Shiga-Toxin 1</i>	I: GCGTTCTTATGTAATGACTGC II: ATCCCACGGACTCTTCCATC	Müller et al., 2006
<i>stx2</i>	<i>Shiga-Toxin 2</i>	I: CGTTTTGACCATCTTCGTCTG II: AGCGTAAGGCTTCTGCTGTG	Müller et al., 2006
<i>stx2e</i>	<i>Shiga-Toxin 2e</i>	I: AATAGTATACGGACAGCGAT II: TCTGACATTCTGGTTGACTC	Bosworth & Casey, 1997
<i>tia</i>	<i>Toxigenic invasion locus in ETEC strains</i>	I: AGCGTTCCGTCAGGACTT II: ACCAGCATCCAGATAGCGAT	Ewers et al., 2007
<i>traT</i>	<i>Transfer protein</i>	I: GTGGTGCGATGAGCACAG II: TAGTTCACATCTTCCACCATCG	Ewers et al., 2007
<i>tsh</i>	<i>Temperature sensitive hemagglutinin</i>	I: ACTATTCTCTGCAGGAAGTC II: CTTCCGATGTTCTGAACGT	Ewers et al., 2004
<i>TspE4.C2</i>	<i>Anonymous DNA fragment</i>	I: GAGTAATGTCGGGGCATTCA II: CGCGCCAACAAAGTATTACG	Clermont et al., 2000
<i>vat</i>	<i>Vacuolating autotransporter toxin</i>	I: TCCTGGGACATAATGGCTAG II: GTGTCAGAACGGAATTGTC	Ewers et al., 2004
<i>yjaA</i>	<i>Uncharacterized protein yjaA</i>	I: TGAAGTGTCAGGAGACGCTG II: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	Clermont et al., 2000

3.4 Zelllinie: IPEC-J2-Zellen

Zur Durchführung der Adhäsionsassays wurde die porcine Epithelzelllinie IPEC-J2 (*Intestinal Porcine Epithelial Cell–Jejunum 2*) genutzt. Sie stammt aus nicht transformierten Epithelzellen eines neugeborenen, nicht gesäugten Ferkels und wurde von Schierack et al. [183] als ein *in vitro*-Modell für Untersuchungen zu Interaktionen zwischen Bakterien und intestinalen Epithelzellen des Schweins charakterisiert.

3.5 Nähr- und Selektivnährmedien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die aufgeführten Medien mit destilliertem Wasser (*Aqua bidestillata*) hergestellt und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Schafblut-Nährmedium

- 10 g/l Pepton
- 3 g/l Hefeextrakt
- 6 g/l Natriumchlorid
- 1 g/l Glukose
- 12 g/l Agar
- Zusatz: definiertes Schafblut 5 %
- 37 g/l dieser Mischung in A. bidest. suspendieren

LB-Nähragar

- 10 g/l Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l NaCl
- 15 g/l Agar

LB-Bouillon nach Miller (*Lysogeny Broth*)

- 10 g/l Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l NaCl

LB-Weichagar

- 10 g/l Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 10 g/l NaCl
- 2,5 g/l Agar-Agar

Chromagar Orientierung

- 32,3 g/l Chromagar Orientierung (CHROMagar, Paris, Frankreich)

BHI-Bouillon (*Brain Heart Infusion Bouillon*)

- 6 g/l Kalbshirn
- 6 g/l Rinderherz
- 10 g/l Proteosepepton
- 3 g/l Glukose
- 5 g/l Natriumchlorid
- 2,5 g/l di-Natriumhydrogenphosphat
- 37 g/l dieser Mischung in A. bidest. suspendieren

Citrat-Agar (nach Simmons)

- 0,3 g/l Magnesiumsulfat
- 1 g/l Ammoniumphosphat
- 1 g/l Dikaliumhydrogenphosphat
- Natriumacetat • 5¹/₂ H₂O

Kligler-Eisen-Agar

- 10 g/l pankreatisch abgebautes Casein
- 10 g/l verdautes Tiergewebe
- 10 g/l Laktose
- 1 g/l Glukose
- 5 g/l NaCl
- 0,5 g/l Ammoniumeisen(III)-citrat
- 0,5 g/l Natriumthiosulfat
- 15 g/l Agar
- 25 mg/l Phenolrot

LIM-Medium (*lysine indole motility*)

- 5 g/l Bakto-Pepton
- 3 g/l Hefeextrakt
- 15 g/l tryptisch verdautes Caseinpepton
- 1 g/l Glukose
- 5 g/l L-Lysin-Monohydrochlorid
- 5 g/l NaCl
- 16 mg/l Bromcresolpurpur
- 2 g/l Agar

Harnstoff-Agar

- 1 g/l pankreatisch abgebaute Gelatine
- 1 g/l Glukose
- 5 g/l NaCl
- 2 g/l Kaliumphosphat
- 12 mg/l Phenolrot
- 15 g/l Agar

3.6 Lösungen und Puffer

Häufig verwendete Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die folgenden Lösungen mit A. bidest. hergestellt und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

- 10xPBS 80 g/l NaCl; 2 g/l Kaliumchlorid; 11,5 g/l Na₂HPO₄;
2 g/l KH₂PO₄; pH 7,4
- 10xTBE 107,8 g/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; 55 g/l
Borsäure; 40 ml/l einer 500 mmol/l EDTA-Lösung
- 10xTE 12,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 37,25 g EDTA;
pH 7,5

Lösungen für die PFGE

- ESP-Puffer 186,15 g/l EDTA; 10 g/l Sarcosyl; pH 9,5; sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße)
- Enzypuffer für Xba I 0,121 g Tris base; 0,058 g NaCl; 0,203 g (1x konzentriert, 100 ml) MgCl₂ 6 H₂O; 80 ml A. bidest.; 0,78 ml Mercaptoethanol; pH 8

Lösungen für die Zellkultur

- DMEM/HAM'S Dulbecco's modified Eagle's Medium: DMEM/HAM'S F-12 (1:1), Biochrom, Berlin (D)
- DMEM/HAM'S-FKS Dulbecco's modified Eagle's Medium: DMEM/HAM'S F-12 (1:1), Biochrom, Berlin (D); 5 % fetales Kälberserum (FKS, hitzeinaktiviert: 56 °C, 30 min)

Lösungen für die PCR und die Agarose-Gelelektrophorese

- 10xPCR buffer 200 mM Tris HCl (pH 8,4); 500 mM Kaliumchlorid; Rapidozym GmbH, Berlin (D)
- Magnesiumchloridlösung 50 mM; Rapidozym
- dNTP 10 mM dATP; 10 mM dCTP; 10 mM, dGTP; 10 mM dTTP; Promega Corporation, Mannheim (D)
- 5xLadepuffer 50 % Glycerin; 100 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8,0); 1 mM TRIS-HCL (10 mM Stammlösung, pH 8,0); 0,025 % Bromphenolblau

3.7 Enzyme

- DNA-Polymerase, BioTherm Rapidozym, Berlin (D)
- XbaI Promega, Madison (USA)
- Proteinase K Serva, Heidelberg (D)

3.8 Größenmarker

- 100 bp-DNA-Leiter extended (100-5000 bp) Roth, Karlsruhe (D)
- Lambda Ladder PFGE Marker (21 Fragmente, 8.5 - 1,0185 kb) New England Biolabs, Frankfurt am Main (D)

3.9 Farbstoffe

- Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Roth, Karlsruhe, (D)
- FITC-Phalloidin Sigma-Aldrich, München (D)
- Propidiumiodid (PI) Invitrogen, Karlsruhe (D)

3.10 Verbrauchsmaterialien

- Kryoröhrchen Greiner-Bio-One-GmbH, Frickenhausen (D)
- Einmalküvetten Labor-Brand, Gießen (D)
- Glasdeckgläser
Ø 10 mm, Thorns Biologiebedarf, Göttingen (D)
Ø 12 mm und 15 mm, Roth, Karlsruhe (D)
Ø 15 mm mit korrigierter Dicke ($0,17 \pm 0,01$ mm), Hecht-Assistent, Sondheim (D)
- Multilochplatten 12- und 24-Loch-Zellkulturplatten, CellBIND, Corning, Schiphol-Rijk (Niederlande)
- Objektträger 76x26 mm, Roth, Karlsruhe (D)
- Pipettenspitzen (2,5-1000 µl) Sarstedt, Nümbrecht, (D)
- Reaktionsgefäße (0,5-2 ml) Eppendorf, Hamburg (D)
- Reaktionsgefäße (15-50 ml) Greiner-Bio-One-GmbH, Frickenhausen (D)

- Spritzenfilter Rotilabo-Spritzenfilter 0,45 µm und 0,22 µm Porengröße, Roth, Karlsruhe (D)
- Zellkulturflaschen 25 cm²- oder 75 cm²-Schräghalsflaschen mit Belüftungskappe, Corning, Schiphol-Rijk (Niederlande)

3.11 Verwendete Geräte

- Absauger Vacuboy, neolab, Heidelberg (D)
- Absaugpumpe N735 AN18, KNF Neuberger, Freiburg (D)
- Agarose-Gelelektrophorese-Kammer B1A und GE-B2, AGS, Heidelberg (D)
- Analysenwaage BP210S, Sartorius, Göttingen (D)
LA 230S, Sartorius, Göttingen (D)
- Autoklav GTA 16, Gössner, Hamburg (D)
- Cooling Module Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
- Eismaschine ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen (D)
- Fotodrucker Gel-dokumentation P93E, Mitsubishi Electric, Ratingen (D)
- Geldokumentation UVT 28 MP, Kamera E.A.S.Y. 429 K,
UV-Transilluminator Dokumentationssystem RM6, Herolab, Wiesloch (D)
- Grobwaage BL3100, Sartorius, Göttingen (D)
BP2100, Sartorius, Göttingen (D)
- Inkubationsschränke CB150, Binder, Tuttlingen (D)
VT 5042 EK/N2, Heraeus, Hanau (D)
- Magnetrührer IKAMAG RET, Theodor Karow, Berlin (D)
Variomag, H+P Labortechnik AG, München (D)
RCT basic, IKA Labortechnik, Stauffen (D)
- Mikrowellen LG Electronics Deutschland GmbH, Drillich (D)
Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe (D)
- Netzgerät Elektrophorese PS 250, Hybaid, Lexington (USA)
- pH-Meter Mikroprozessor pH-Meter 740, Knick, Berlin (D)
- Pipettierhilfe Pipetus-akku, Hirschmann, Eberstadt (D)

- Pulsfeld-Gelelektrophorese-Kammer Bio-Rad Laboratories, (USA)
- Reinstwassersystem Millipore Simplicity, Millipore GmbH, Schwalbach (D)
- Scanner DUOSCAN T1200, AGFA, Köln (D)
- Schüttelinkubator GFL3031, GFL, Burgwedel (D)
- Spektrophotometer Ultrospec 3000 pro, Amersham, Freiburg (D)
- Sterilwerkbank Heraeus Instruments HB2448, Hanau (D)
- Thermoblock Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg (D)
- Thermocycler T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen (D)
- Umkehrmikroskop Telaval 31, Zeiss, Jena (D)
- Variable Speed Pump Bio-Rad Laboratories, (USA)
- Vortexer MS2 Minishaker, IKA, Staufen (D)
Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York (USA)
- Wasserbäder Grant OLS 200, CLF Laborgeräte, Burgwedel (D)
E-5, Julabo, Seelbach (D)
Th. Karow GmbH, Berlin (D)
- Werkbank LaminAir HB 2448 und LB-48-C, Heraeus, Hanau (D)
- Wippe Roto-Shake Genie, Scientific Industries, Bohemia, (USA)
- Zentrifugen 3K30, Sigma Laborzentrifugen, Osterode (D)
5415D, Eppendorf Zentrifugen, Engelsdorf (D)

3.12 Chemikalien

- Agar-Agar, Kobe I Roth, Karlsruhe (D)
- Agarose NEEO Roth, Karlsruhe (D)
- Borsäure Roth, Karlsruhe (D)
- Dodecylsulfate Na-salt (SDS) Serva, Heidelberg (D)
- EDTA Roth, Karlsruhe (D)
- Ethanol 96 %, vergällt Roth, Karlsruhe (D)
- Ethidiumbromid 1 % Roth, Karlsruhe (D)
- Glycerin Roth, Karlsruhe (D)
- Hefeextrakt Roth, Karlsruhe (D)

- Kaliumchlorid Merck, Darmstadt (D)
- Kaliumhydrogenphosphat Merck, Darmstadt (D)
- Lysozym Serva, Heidelberg (D)
- Magnesiumchlorid Merck, Darmstadt (D)
- Mercaptoethanol Merck, Darmstadt (D)
- Natriumchlorid Roth, Karlsruhe (D)
- Natriumhydrogenphosphat Roth, Karlsruhe (D)
- Pulsed Field Certified Agarose Bio-Rad, München (D)
- Thioharnstoff Roth, Karlsruhe (D)
- Trisaminomethan Roth, Karlsruhe (D); Sigma-Aldrich, München (D)
- Trypton/ Pepton aus Casein Roth, Karlsruhe (D)

4. Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Probennahme

Die Proben wurden von 119 Wildschweinen aus Brandenburg, Berlin, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern während verschiedener Jagden in den Jahren 2006 bis 2008 gewonnen. Von 63 Wildschweinen wurden dabei im Zeitraum von 2006 bis 2007 Jejunum, Ileum und/oder Kolon am Jagdort eröffnet, um Digestaprobe zu entnehmen. Von den anderen 56 Wildschweinen wurden während der Jagdsaison 2007/2008 Tupferproben aus dem distalen Rektum jedes frisch erlegten Tieres entnommen und bei 4 bis 7 °C gelagert.

4.1.2 Anzucht der Bakterien

Im Anschluss an die Jagden wurde von den 63 Wildschweinen, denen Digestaprobe entnommen worden waren, bei 21 Tieren die Digesta aus Jejunum, Ileum und Kolon nach dezimaler Verdünnung in 1xPBS auf MacConkey-Agar ausplattiert. Nach achtzehnstündiger

Inkubation bei 37 °C wurden zehn laktosepositive Kolonien pro Platte zufällig ausgewählt und auf CHROMAgar-Orientierungsplatten und auf GASSNER-Platten ausgestrichen. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden für die weiteren Untersuchungen nur Kolonien herangezogen, die auf CHROMAgar-Orientierungsplatten pink und auf GASSNER-Platten blau-grün gewachsen waren. Der verwendete CHROMAgar-Orientierung enthält chromogene Substanzen, die durch genus- und speziesspezifische Enzyme abgebaut werden und zu einem unterschiedlich farbigen Koloniewachstum führen. *E. coli* wachsen zu 99,3 % als pink gefärbte Kolonien [136]. Der verwendete GASSNER-Agar ist ein selektives Differenzierungsmedium zur gezielten Anzucht von *Enterobacteriaceae*, der gleichzeitig zum Nachweis der Laktoseverwertung dient. *E. coli* wachsen unter dunkelblauer Verfärbung des Nährmediums.

Von den restlichen 42 Wildschweinen wurde nur die Digesta aus dem Kolon nach dezimaler Verdünnung auf MacConkey-Agar ausplattiert. Nach anschließender Inkubation wurde eine Kolonie pro Platte zufällig ausgewählt und wie oben beschrieben auf CHROMAgar-Orientierungsplatten und GASSNER-Platten ausgestrichen.

Die 56 Tupferproben wurden auf CHROMAgar-Orientierungsplatten ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Pro Platte wurde eine pink gefärbte Bakterienkolonie für die weiteren Untersuchungen verwendet.

4.1.3 Konservierung der *E. coli*-Stämme

Zur Konservierung wurde eine Kolonie einer über Nacht bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte gewachsenen Subkultur im 3 ml LB-Flüssignährmedium angeimpft und bei 200 rpm und 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 2$ inkubiert. 1 ml dieser Bakterienkultur wurden mit 330 µl 80 % Glycerin vermischt und in einem 2 ml Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

4.1.4 Biochemische Differenzierung der coliformen Kolonien

Zur weiteren Differenzierung der coliformen Isolate wurden die Zuckerverwertung, die H₂S-Bildung und die Gasentstehung im Kligler-Agar getestet. Zum Nachweis des aeroben Zuckerabbaus wurde die Schrägfläche des Agars beimpft, wohingegen der Nachweis der anaeroben Zuckerverwertung und der Gasbildung durch Stichbeimpfung des unteren Agaranteils erfolgte. Der Glukoseabbau führt zu einer Ansäuerung des Mediums, die den Farbumschlag des Indikators Phenolrot von rot nach gelb bewirkt. Bei anaerober Zuckerverwertung entstehen im unteren Teil des Röhrchens Gasblasen, die den Agar spalten können. H₂S entsteht durch die Reduktion von Natriumthiosulfat und reagiert mit

Eisen(III)salzen zu schwarzem Eisensulfid. *E. coli* bauen Zucker sowohl aerob als auch anaerob unter Gasbildung ab und können Natriumthiosulfat nicht zu H₂S reduzieren.

Um den Lysinabbau, die Indolbildung und die Beweglichkeit der Bakterienisolate zu überprüfen, wurde der LIM-Agar stichbeimpft. *E. coli* sind durch das Enzym Lysindecaboxylase in der Lage, Lysin anaerob zu spalten und bewirken dadurch eine Alkalisierung des Mediums mit entsprechendem Farbumschlag des Indikators Bromcresolpurpur nach violett. Nach Zugabe des Kovács-Reagenz bilden *E. coli* aus Tryptophan Indol, das als roter Ring sichtbar wird. Eine diffuse Trübung des halbfesten Mediums kann als Nachweis der Beweglichkeit herangezogen werden.

Weiterhin können *E. coli* das Enzym Urease nicht bilden und damit keinen Harnstoff in CO₂ und Ammoniak spalten. Nach Beimpfen eines Harnstoffschrägagars führt dies also nicht zu einer Alkalisierung des Mediums und der Agar bleibt blassrosa. Ebenso wenig sind *E. coli* in der Lage, Citrat zu verwerten; daher kommt es nicht zu einer Alkalisierung des Simmons-Citrat Agars.

4.1.5 Hämolyseverhalten

Die *E. coli*-Isolate wurden auf Blutagarplatten fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die Produktion von Hämolysinen werden Erythrozyten zerstört und das Hämoglobin wird vollständig abgebaut. Dabei entsteht um die Bakterienkolonie herum eine klare Hämolysezone.

4.1.6 Beweglichkeit

Um die Beweglichkeit der *E. coli*-Isolate zu überprüfen, wurden Weichagarplatten verwendet. Pro Agarplatte wurden drei *E. coli*-Isolate von Wildschweinen sowie der Kontrollstamm EcN eingesetzt. Am Vortag des Testes wurden die kryokonservierten Bakterienstämme auf LB-Platten übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Jedes Viertel der Agarplatte wurde mit einer einzeln liegenden Kolonie des zu untersuchenden *E. coli*-Isolats von der LB-Platte stichbeimpft. Dabei wurde darauf geachtet, den Weichagar nicht vollständig mit der Impföse zu durchstechen, um ein Wachstum der *E. coli*-Isolate unterhalb des Agars zu verhindern. Die Agarplatten wurden bei 37 °C sechzehn Stunden inkubiert. Beurteilt wurde die Beweglichkeit der Bakterienisolate nach der Größe des Schwärmhofs. *E. coli*-Isolate, die kein Wachstum außerhalb des Stichkanals aufwiesen, wurden als „unbeweglich“ eingestuft. *E. coli*-Isolate, deren Schwärmhofdurchmesser kleiner als fünf Millimeter war, wurden als „geringgradig beweglich“ bewertet. Lag der Schwärmhofdurchmesser zwischen fünf und zwanzig

Millimetern, wurden die entsprechenden *E. coli*-Isolate als „mittelgradig beweglich“ eingeschätzt. Ein Schwärmhofdurchmesser von über 20 Millimetern führte zur Einstufung „hochgradig beweglich“.

4.1.7 Prüfung des Kohlenhydratstoffwechsels

Um die Fermentation von Kohlenhydraten und ihren Derivaten zu überprüfen, wurde das api 50 CH – System (BioMérieux, Deutschland GmbH) gemäß beiliegender Arbeitsanleitung verwendet. Das System umfasst 50 biochemische Reaktionen, darunter eine Negativkontrolle (Tab. 9).

Tab. 9 Substrate des api 50 CH – Systems (BioMérieux, Deutschland GmbH)

Nr. Substrat	Nr. Substrat
0 Negativkontrolle	25 Esculin
1 Glycerin	26 Salicin
2 Erythritol	27 D-Cellobiose
3 D-Arabinose	28 D-Maltose
4 L-Arabinose	29 D-Lactose
5 D-Ribose	30 D-Melibiose
6 D-Xylose	31 D-Saccharose
7 L-Xylose	32 D-Trehalose
8 D-Adonitol	33 Inulin
9 Methyl-βD-Xylopyranosid	34 D-Melecitose
10 D-Galaktose	35 D-Raffinose
11 D-Glukose	36 Amidon
12 D-Fruktose	37 Glycogen
13 D-Mannose	38 Xylit
14 L-Sorbose	39 Gentiobiose
15 L-Rhamnose	40 D-Turanose
16 Dulcitol	41 D-Lyxose
17 Inositol	42 D-Tagatose
18 D-Mannitol	43 D-Fucose
19 D-Sorbitol	44 L-Fucose
20 Methyl-αD-Mannopyranosid	45 D-Arabitol
21 Methyl-αD-Glucopyranosid	46 L-Arabitol
22 N-Acetylglucosamin	47 Kaliumglukonat
23 Amygdalin	48 Kalium-2-Ketoglukonat
24 Arbutin	49 Kalium-5-Ketoglukonat

Die Fermentation wird durch eine Farbänderung in den einzelnen Reaktionsräumen angezeigt, da die anaerob entstandene Säure einen Farbumschlag des Indikators Phenolrot bewirkt. Als Medium für die Beimpfung wurde das api 50 CHB/E Medium gewählt, das unter anderem für Gram-negative Stäbchen der Familie *Enterobacteriaceae* bestimmt ist. Der Farbumschlag des Mediums wurde nach den festgelegten Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden visuell ausgewertet und dokumentiert. Vom Hersteller wird empfohlen, den Farbumschlag in einer fünfstufigen Skala zu erfassen, wobei „5“ einem klaren Gelbton entspricht. Es wird

vorgeschlagen, jeden Farbumschlag ab Stufe „3“ als positives Ergebnis zu bewerten. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit ein Farbumschlag des Mediums nach gelb (Stufe 5), gelborange (Stufe 4) oder hellorange (Stufe 3) als positive Reaktion und ein Farbumschlag des Mediums nach orange (Stufe 2) und dunkelorange (Stufe 1) als variable, nicht-positive Reaktion bewertet. blieb das Medium rot (Stufe 0), wurde die Reaktion als negativ eingestuft.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung chromosomaler DNA

Chromosomale DNA wurde durch Hitzelyse aus den Bakterien gewonnen. Zunächst wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Platte in 3 ml LB-Flüssignährmedium übertragen und diese bei 200 rpm und 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 1$ inkubiert. Hiervon wurden 200 µl abgenommen und bei 8000 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl entionisiertem Wasser resuspendiert und anschließend für 10 Minuten auf 99 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf 4 °C wurde die Bakteriensuspension bei 8000 rpm und Raumtemperatur erneut zentrifugiert und der Überstand (etwa 180 µl) bei -20 °C gelagert. Von jedem *E. coli*-Stamm wurden zwei Hitzelysate unabhängig voneinander hergestellt.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung spezifischer Sequenzabschnitte des Genoms sowie zum Nachweis bekannter Nukleinsäuresequenzen. Sie beruht auf der Fähigkeit der DNA-Polymerasen ausgehend von synthetischen DNA-Oligonukleotiden (Primern), einen neuen DNA-Strang an einer Template-DNA entlang zu synthetisieren. Werden gegenläufig orientierte Primer verwendet, kann eine bestimmte DNA-Sequenz zwischen diesen beiden Primern vervielfältigt werden. Durch eine zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird dieser DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert.

Als Template-DNA diente für die vorliegende Arbeit die durch Hitzelyse gewonnene chromosomale bakterielle DNA. Zur Durchführung der PCR wurde ein Gemisch aller Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs, Roti-Mix PCR), PCR-Puffer, $MgCl_2$, entionisiertem Wasser sowie Taq-Polymerase (Rapidozym, Berlin) und Oligonukleotidprimer (Genosys,

Steinheim; Operon, Köln) benutzt. Bei jeder PCR wurde mindestens ein Referenzstamm als Positivkontrolle und eine Leerwertkontrolle mit entionisiertem Wasser mitgeführt.

Zunächst wurden die oben genannten Reagenzien gemischt. Dies wird im Folgenden als Mastermix bezeichnet. Einen ersten Überblick bietet das unten beschriebene Basisprotokoll. Zur Optimierung der Amplifikation wurden die Mengen der einzelnen Reaktionsparameter sowie Annealingtemperaturen und Zykluslängen bei den einzelnen PCR-Untersuchungen variiert.

Reaktionsansatz:

DNA-Template (Hitzelysat)	3,0 µl
PCR-Puffer (10x)	3,0 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,2 µl
dNTPs (10mM je Nukleotid)	0,5 µl
Primer forward (100 pmol/µl)	0,1 µl
Primer reverse (100 pmol/µl)	0,1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Entionisiertes Wasser	17,0 µl

Programmablauf:

1	Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Primer-Hybridisierung	55 °C	1 min
4	Polymerisation	72 °C	1 min
		Schritt 2 bis 4	30 Zyklen
5	Endpolymerisation	72 °C	10 min

Zur gleichzeitigen Analyse von zwei oder mehr DNA-Abschnitten wurden teilweise bis zu neun PCR-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß kombiniert. Dies wird im Folgenden als Multiplex-PCR (mPCR) bezeichnet. Die Wechselwirkungen der verschiedenen Primer können hierbei zur Bildung unspezifischer Produkte und Primer-Dimeren führen. Daher mussten Primerkonzentrationen, Mg²⁺-Konzentration, Menge des Puffers und der Polymerase sowie die Annealingtemperatur angepasst und optimiert werden.

4.2.2.1 PCR nach Casey und Bosworth

Die PCR nach Casey und Bosworth [38] dient zum Nachweis von neun für schweinepathogene *E. coli* typischen Virulenzgenen. Dazu zählen die Gene, die Toxine kodieren: *eltB* (hitzelabiles Enterotoxin LT-Ib), *est Ia* (hitzestabiles Enterotoxin ST-Ia), *est II* (hitzestabiles Enterotoxin ST-II) und *stx2e* (Shiga-Toxin 2e) sowie Gene, die Fimbrien

kodieren: *faeG* (F4-Fimbrien), *fanA* (F5-Fimbrien), *fasA* (F6-Fimbrien), *fedA* (F18ab- und F18ac-Fimbrien) und *fimF41a* (F41-Fimbrien).

Reaktionsansatz:

DNA-Template	3,0 µl
PCR-Puffer (10x)	3,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,2 µl
dNTPs	0,4 µl
Primermix I* (je 10 pmol/µl)	3,0 µl
Primermix II** (je 10 pmol/µl)	3,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Entionisiertes Wasser	14,3 µl

* Primermix I: Primer mit den Nummern: IMT 949, IMT 953, IMT 954, IMT 945, IMT 946, IMT 947, IMT 951, IMT 952, IMT 941

** Primermix II: Primer mit den Nummern: IMT 950, IMT 955, IMT 956, IMT 948, IMT 943, IMT 944, IMT 942, IMT 957, IMT 958

Programmablauf:

1	Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Primer-Hybridisierung	55 °C	1 min
4	Polymerisation	72 °C	1 min
		Schritt 2 bis 4	30 Zyklen
5	Endpolymerisation	72 °C	10 min

4.2.2.2 PCR nach Clermont et al.

Die PCR nach Clermont et al. [44] ermöglicht die phylogenetische Einteilung von *E. coli* in die vier Hauptgruppen A, B1, B2 und D. Sie stellt eine Triplex-PCR zum Nachweis von zwei Genen (*chuA* und *yjaA*) sowie dem anonymen DNA-Fragment *TspE4.C2* dar. Vertreter der Gruppen B2 und D besitzen im Gegensatz zu denen der Gruppen A und B1 das Eisenrezeptorgen *chuA*. Mitglieder der Gruppe B2 wiederum sind *yjaA*-positiv, wodurch man sie von denen der Gruppe D unterscheiden kann. Zur Gruppe B1 zählende *E. coli* weisen anders als Vertreter der Gruppe A *TspE4.C2* auf.

Reaktionsansatz:

DNA-Template		3,0	µl
PCR-Puffer (10x)		2,5	µl
MgCl ₂ (50 mM)		2,0	µl
dNTPs		0,5	µl
Primer: IMT 445 und IMT 446 (je 100 pmol/µl)	je	0,05	µl
Primer: IMT 447 und IMT 448 (je 100 pmol/µl)	je	0,05	µl
Primer: IMT 449 und IMT 450 (je 100 pmol/µl)	je	0,05	µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)		0,1	µl
Entionisiertes Wasser		16,6	µl

Programmablauf:

1	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
2	Denaturierung	94 °C	30 sec
3	Primer-Hybridisierung	61 °C	30 sec
4	Polymerisation	72 °C	3 min
		Schritt 2 bis 4	30 Zyklen
5	Endpolymerisation	72 °C	10 min

4.2.2.3 PCR nach Ewers et al.

Ewers et al. [63] haben zum Nachweis von 34 virulenzassoziierten Genen (VAGs) eine Kombination aus vier Multiplex-PCR-Untersuchungen etabliert (mPCR I-IV). Die Zuordnung der VAGs zu der entsprechenden mPCR ist Tab. 10 zu entnehmen.

Tab. 10 Übersicht über die in vier Multiplex-PCR-Untersuchungen nachweisbaren VAGs

mPCR I	mPCR II	mPCR III	mPCR IV
<i>afa/draB</i> ¹	<i>chuA</i> ²	<i>papC</i> ¹	<i>crlA</i> ¹
<i>fimC</i> ¹	<i>iroN</i> ²	<i>tsh</i> ¹	<i>mat</i> ¹
<i>hra</i> ¹	<i>sitD chr.</i> ²	<i>irp2</i> ²	<i>feoB</i> ²
<i>iha</i> ¹	<i>sitD ep.</i> ²	<i>iucD</i> ²	<i>fyuA</i> ²
<i>sfa/foc</i> ¹	<i>ompA</i> ³	<i>cvi/cva</i> ³	<i>ireA</i> ²
<i>kpsMTII</i> ³	<i>traT</i> ³	<i>iss</i> ³	<i>cnf1/2</i> ⁴
<i>neuC</i> ³	<i>gimB</i> ⁵	<i>astA</i> ⁴	<i>sat</i> ⁴
<i>hlyA</i> ⁴	<i>ibeA</i> ⁵	<i>vat</i> ⁴	<i>tia</i> ⁵
<i>malX</i> ⁶			
<i>pic</i> ⁶			

VAGs kodieren für:

1 = Adhäsine; 2 = Eisenaufnahmesysteme; 3 = Serumresistenzsysteme; 4 = Toxine; 5 = Invasine; 6 = Sonstige

Programmablauf:

1	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
2	Denaturierung	94 °C	30 sec
3	Primer-Hybridisierung	58 °C	30 sec
4	Polymerisation	62 °C	3 min
		Schritt 2 bis 4	25 Zyklen
5	Endpolymerisation	72 °C	10 min

Reaktionsansatz:

	mPCR I		mPCR II		mPCR III		mPCR IV	
DNA-Template	3,0	µl	3,0	µl	3,0	µl	3,0	µl
PCR-Puffer (10x)	2,5	µl	2,5	µl	2,5	µl	2,5	µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	µl	2,0	µl	2,0	µl	2,0	µl
dNTPs	0,5	µl	0,5	µl	0,5	µl	0,5	µl
Primermix I (je 10 pmol/µl)	10,0	µl	—		—		—	
Primermix II (je 10 pmol/µl)	—		8,0	µl	—		—	
Primermix III (je 10 pmol/µl)	—		—		8,0	µl	—	
Primermix IV (je 10 pmol/µl)	—		—		—		8,0	µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,075	µl	0,075	µl	0,075	µl	0,075	µl
Entionisiertes Wasser	7,0	µl	9,0	µl	9,0	µl	9,0	µl
Primermix I	Primer mit den Nummern: IMT 2084, IMT 1544, IMT 21, IMT 22, IMT 1071, IMT 1072, IMT 33, IMT 34, IMT 1547, IMT 1546, IMT 1564, IMT 1565, IMT 1904, IMT 1905, IMT 1604, IMT 1605, IMT 1610, IMT 1611, IMT 1566, IMT 1567							
Primermix II	Primer mit den Nummern: IMT 445, IMT 446, IMT 1056, IMT 1057, IMT 902, IMT 903, IMT 1765, IMT 1766, IMT 1261, IMT 1262, IMT 1608, IMT 1609, IMT 904, IMT 905, IMT 1762, IMT 1763							
Primermix III	Primer mit den Nummern: IMT 762, IMT 763, IMT 1847, IMT 1848, IMT 15, IMT 16, IMT 31, IMT 32, IMT 1828, IMT 1829, IMT 23, IMT 24, IMT 25, IMT 26, IMT 1069, IMT 1070							
Primermix IV	Primer mit den Nummern: IMT 1863, IMT 1864, IMT 1867, IMT 1868, IMT 11, IMT 12, IMT 1941, IMT 1942, IMT 840, IMT 841, IMT 13, IMT 14, IMT 2086, IMT 2087, IMT 1864, IMT 1865							

4.2.2.4 PCR nach Müller et al.

Um enteropathogene *E. coli* (EPEC), atypische EPEC (aEPEC) und Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC) in möglichst kurzer Zeit zu identifizieren und zu differenzieren, haben Müller et al. eine Multiplex-PCR entwickelt, die den Nachweis der vier Markergene *escV*, *bfpB*, *stx1*, and *stx2* ermöglicht [145].

Reaktionsansatz:

DNA-Template		3,0	µl
PCR-Puffer (10x)		2,5	µl
MgCl ₂ (50 mM)		1,0	µl
dNTPs		0,3	µl
IMT 2885 und IMT 2886 (je 100 pmol/µl)	je	0,1	µl
IMT 2887 und IMT 2888 (je 100 pmol/µl)	je	0,1	µl
IMT 2889 und IMT 2890 (je 100 pmol/µl)	je	0,1	µl
IMT 2891 und IMT 2892 (je 100 pmol/µl)	je	0,1	µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)		0,1	µl
Entionisiertes Wasser		17,3	µl

Programmablauf:

1	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2	Denaturierung	95 °C	1 min
3	Primer-Hybridisierung	58 °C	1 min
4	Polymerisation	72 °C	1 min
		Schritt 2 bis 4	30 Zyklen
5	Endpolymerisation	72 °C	10 min

4.2.2.5 PCR zum Nachweis von *paa*, *aidA-I* und *sepA* [28]

Die drei Gene *paa*, *aidA-I* und *sepA* wurden von Boerlin et al. in *E. coli* aus dem Darm von gesunden und an Diarrhoe erkrankten Hausschweinen nachgewiesen [28]. Die Primer zum Nachweis des Adhäsingens *aidA-I* wurden der Veröffentlichung von Ngeleka et al. entnommen [150]. Die Primer für das Nicht-Fimbrien-Adhäsingens *paa* und *sepA* (für das „secretion of *E. coli* proteins“ kodierende Gen) entstammen der Veröffentlichung von Boerlin et al. [28].

Reaktionsansatz:

	<u><i>paa</i></u>	<u><i>aidA-I</i></u>	<u><i>sepA</i></u>
DNA-Template	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
dNTPs	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Primer: IMT 1997 und IMT 1998 (je 100 pmol/µl)	je 0,1 µl	—	—
Primer: IMT 1999 und IMT 2000 (je 100 pmol/µl)	—	je 0,1 µl	—
Primer: IMT 2001 und IMT 2002 (je 100 pmol/µl)	—	—	je 0,1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
Entionisiertes Wasser	16,7 µl	16,7 µl	16,7 µl

Programmablauf:

1	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Primer-Hybridisierung		
	paa	59 °C	1 min
	aidA-I	52 °C	1 min
	sepA	62 °C	1 min
4	Polymerisation	72 °C	1 min
		Schritt 2 bis 4	30 Zyklen
5	Endpolymerisation	72 °C	10 min

4.2.2.6 RAPD (*random amplified polymorphic DNA*)-PCR

Die RAPD-PCR wurde eingesetzt, um Isolate desselben Klons zu identifizieren, falls der Verdau der *E. coli*-DNA mithilfe des Restriktionsenzym *XbaI* misslang. Bei einer RAPD-PCR werden mit Hilfe kurzer sequenzunspezifischer Single-Primer (Länge etwa 10 Oligonukleotide) unbekannte DNA-Abschnitte amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Abschnitte ergeben nach Auftrennung im Agarosegel ein für jeden Stamm typisches Bandenmuster.

Reaktionsansatz:

DNA-Template	3,0 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl
dNTPs	0,5 µl
IMT 1759, IMT 1718 oder IMT 1719 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,5 µl
Entionisiertes Wasser	15,5 µl

Programmablauf:

1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	95 °C	1 min
3	Primer-Hybridisierung	36° C	1 min
4	Polymerisation	72 °C	1 min
		Schritt 2 bis 4	45 Zyklen
5	Endpolymerisation	72 °C	10 min

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Nukleinsäuren. Durch ein elektrisches Feld werden negativ geladene Nukleinsäurefragmente durch eine Gelmatrix gezogen. Kleinere Moleküle bewegen sich aufgrund der Porengröße des Gels schneller als

größere. Durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe kann die Fragmentgröße ermittelt werden.

Es wurden 1,2 g bis 1,5 g Agarose durch Aufkochen in 100 ml 1xTBE gelöst. Nach Abkühlung auf 70 °C und Zugabe von 1 µl Ethidiumbromidlösung (1 %) wurde das noch flüssige Gel in einen Gelschlitten mit Probentaschenkamm gegossen und zum Erstarren eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Nach Entfernung des Probenkamms wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl 5xLadepuffer gemischt und in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Ein 100 bp-Marker wurde als Größenstandard aufgetragen. Zur Auftrennung der Fragmente wurde ein elektrisches Feld von 100-120 V für 45 bis 75 Minuten angelegt. Anschließend wurden die Amplifikatfragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Videoprintersystem photodokumentiert.

4.2.4 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Auftrennung von bis zu 20 Mbp großen DNA-Fragmenten und dient der Analyse und der Subtypisierung von Bakterienstämmen. Große Moleküle können durch die beim Pipettieren entstehenden Scherkräfte beschädigt werden; daher erfolgen die Zellyse und die Restriktion in Agaroseblöckchen. Die so gewonnene DNA wird zunächst mittels Restriktionsendonukleasen gespalten. Die dabei entstandenen DNA-Fragmente werden einem die Richtung wechselnden elektrischen Feld ausgesetzt, um eine Nettovorwärtsbewegung der Moleküle zu erzielen. Bei der hier verwendeten CHEF-Methode (*contour-clamped homogeneous electric fields*) sind die Elektroden hexagonal um das Gel angeordnet und die Richtung der elektrischen Feldvektoren ist gegenüber der vertikalen Achse des Gels um + 60 °C bzw. – 60 °C verschoben.

Probenvorbereitung: Die *E. coli*-Isolate wurden über Nacht auf einer LB-Platte bei 37 °C angezüchtet; anschließend wurden 300 µl LB-Flüssignährmedium mit einer Einzelkolonie von der LB-Platte beimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 1xPBS wurde die Bakterienlösung bei 8000 rpm 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl 1xPBS resuspendiert. Nach Zufügen von 1 ml 1xPBS wurde die Bakterienlösung erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet in 250 µl 1xPBS resuspendiert. Eine 1,2-prozentige Agaroselösung wurde aus *pulsed field certified* Agarose und 1xTBE hergestellt und auf 60 °C gekühlt. Zum Gießen der Agaroseblöckchen wurden 375 µl der Agarose-Gellösung mit 250 µl der Bakterienlösung unter Vermeidung von Bläschenbildung vorsichtig

gemischt und in die Gussförmchen (100 µl Fassungsvermögen) gefüllt. Die frisch gegossenen Blöckchen wurden zum Erstarren eine Stunde bei 4 °C gelagert und danach in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt. Zur Zellwandlyse wurden pro Blöckchen 500 µl ESP-Puffer und 0,9 mg Proteinase K zugefügt. Danach wurden die Blöckchen bei 56 °C für 48 Stunden im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden die Blöckchen zweimalig für 90 Minuten bei 4 °C und 30 rpm in jeweils 8-10 ml 1xTE gewaschen, halbiert und jede Hälfte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml 1xTE wurden die Blöckchen bei 4 °C gelagert.

Restriktionsverdau: Zur Equilibrierung wurde die TE-Lösung entfernt und die Blöckchen wurden in jeweils 500 µl *XbaI*-Puffer für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernung des *XbaI*-Puffers wurde pro Blöckchen ein Gemisch aus 150 µl *XbaI*-Puffer, 1,5 µl BSA-Puffer und 0,83 µl *XbaI* zugegeben und die Blöckchen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Puffergemisch entfernt und pro Blöckchen 1 ml 1xTE zugefügt.

Elektrophorese

Zum Gießen des 1,2-prozentigen Agarose-Gels wurden 1,56 g *pulsed field certified* Agarose in 130 ml 0,5xTBE aufgekocht und nach Abkühlung auf 60 °C in eine 13 x 14 cm große Pulsfeldgelkammer mit aufgesetztem Probenkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels und dem Entfernen des Kamms wurden die Agaroseblöckchen mit einem Spatel in die entsprechenden Geltaschen eingesetzt und mit Resten des Agarose-Gels versiegelt. Mitgeführt wurden jeweils der *Lambda Hind3* Marker als Größenmarker und der *E. coli*-Stamm EDL 933 als Referenzstamm. Die Elektrophorese wurde in einer CHEF-DR III-Pulsfeldkammer von Biorad (München) durchgeführt. Die Kammer wurde mit 2,3 l 0,5xTBE (Laufpuffer) befüllt und das Gel in die auf 14 °C gekühlte Pufferlösung gelegt. Für die Elektrophorese wurden folgende Bedingungen verwendet: Laufzeit: 22 Stunden, Temperatur: 14 °C, Winkel: 120 °, Spannung: 6 V, Puls: 5-50 Sekunden. Anschließend wurde das Gel für eine Stunde bei 200 rpm mit einer Ethidiumbromidlösung (0,5 %) inkubiert und anschließend mit A. bidest. gespült. Die dadurch sichtbaren DNA-Fragmentmuster wurden mittels Videoprintersystem unter UV-Licht photodokumentiert. Bei Stämmen, deren DNA-Fragmente durch reaktive Tris-Radikale während der Elektrophorese abgebaut wurden, konnte der DNA-Abbau durch Zugabe von 100 µM Thioharnstoff in den Laufpuffer verhindert und ein Fragmentlängenmuster erstellt werden [126].

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Zellkultur

Für die Untersuchungen zur Adhäsion wurden IPEC-J2-Zellen genutzt [183]. Sie wurden in 5 ml DMEM/HAM'S-FKS in 25 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und bei einem CO₂-Gehalt von 5 %, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und einer Umgebungstemperatur von 37 °C inkubiert. Das Medium wurde einen Tag nach der Subkultivierung bzw. am Tag vor dem Adhäsionstest gewechselt.

Subkultivierung

Die als konfluenter Monolayer gewachsenen, adhärenen IPEC-J2-Zellen wurden alle sechs bis acht Tage subkultiviert. Für die Subkultivierung wurden die Zellen nach Entfernung des Zellkulturmediums mit 8 ml 1xPBS gewaschen und anschließend für acht bis zehn Minuten in Trypsin/EDTA bei 37 °C bis zur Ablösung der Zellen aus dem Zellverband und vom Boden der Zellkulturflasche inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden bei einer relativen Zentripetalbeschleunigung von 155 x g fünf Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml DMEM/HAM'S-FKS resuspendiert. $3,4 \times 10^4$ Zellen wurden in 5 ml Medium in eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche überführt.

Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl der lebenden IPEC-J2-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen in 1xPBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert sowie in DMEM/HAM'S-FKS resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit Trypanblau 1:10 verdünnt. Der Farbstoff kann nur in abgestorbene Zellen eindringen und färbt diese blau. Anschließend wurden die nicht gefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die Konzentration der Zellen durch Multiplikation der Anzahl der gezählten Zellen mit der Verdünnungsstufe (10) und der Ausgangsmenge an Zellsuspension ermittelt.

4.3.2 Adhäsionstest

Für die Adhäsionstests wurden $1,7 \times 10^4$ Zellen/Well in 1 ml DMEM/HAM'S-FKS in eine 12-Well-Zellkulturplatte eingesät und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers innerhalb der nächsten sechs bis sieben Tage wurde nach Erneuerung des Mediums mit dem Adhäsionstest begonnen. Die durchschnittliche Zellzahl betrug zu diesem Zeitpunkt $2,53 \times 10^5$ Zellen/Well.

Am Vortag eines Adhäsionstests wurden die kryokonservierten Bakterienstämme auf LB-Platten übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zwei bis drei Einzelkolonien wurden am Tag des Adhäsionstests in 3 ml LB-Flüssignährmedium übertragen und bei 200 rpm und 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 1$ inkubiert. 1 ml der Bakteriensuspension wurde bei 8000 rpm fünf Minuten zentrifugiert und das Pellet in 1 ml DMEM/HAM'S-FKS resuspendiert. Die IPEC-J2-Zellen wurden mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 100 inokuliert. Die MOI gibt das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Agentien zu deren Zielzellen an. Zur gleichmäßigen Verteilung der Bakterien wurde die Zellkulturplatte danach vorsichtig geschwenkt und bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % für zwei Stunden inkubiert. Pro *E. coli*-Stamm wurden drei Wells/Zellkulturplatte verwendet und der Test insgesamt dreimal wiederholt. Nach Ablauf von zwei Stunden wurde der Überstand entfernt. Die Zellen wurden dreimalig mit jeweils 1 ml 1xPBS gewaschen und im Anschluss an jeden Waschgang 30 Sekunden bei 100 rpm geschwenkt, um neben nichtadhärenten Bakterien auch unvollständig adhärierende Bakterien von den Zellen zu entfernen. Danach wurden die Zellen unter Zugabe von 1 ml 0,1 % Triton X-100 in A. bidest. lysiert. Die abgelösten Zellen wurden in 150mM NaCl dezimal verdünnt und in der entsprechenden Verdünnungsstufe jeweils auf drei LB-Platten ausplattiert. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Anzahl adhärenter Bakterien nach Auszählung der kolonienbildenden Einheiten (CFU) auf den LB-Platten und Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor ermittelt.

4.4 Fluoreszenzmikroskopie

4.4.1 FAS-Test

Der FAS-Test (*fluorescent actin staining*) dient dem Nachweis der durch A/E-Läsionen hervorgerufenen Aktinakkumulation unterhalb der an den Darmepithelzellen angelagerten EPEC. Aktin ist eine Hauptkomponente des Cytoskeletts eukaryotischer Zellen. Zur Anfärbung wird das mit dem Fluoreszenzstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte Phalloidin verwendet, das das polymerisierte Aktin der Epithelzellen bindet. Mittels Fluoreszenzmikroskopie sind die Aktinakkumulationen als deutlich fluoreszierende Bereiche erkennbar.

Auf Deckgläschen mäßig konfluent gewachsene IPEC-J2-Zellen wurden mit einer MOI = 100 infiziert und zunächst für drei Stunden bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % inkubiert. Nach Wechsel des Medium wurden sie weitere drei

Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen dreimalig mit 1xPBS gespült, mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) überschichtet und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die fixierten Zellen wurden zunächst permeabilisiert, damit die Farbstoffe die Zellwand durchdringen konnten. Hierzu wurden die Deckgläschen zunächst dreimal mit 1xPBS gespült, vier Minuten mit eiskaltem 1 % Triton-X 100 in 1xPBS auf Eis bedeckt und wiederum dreimal mit 1xPBS gespült. Zum Anfärben des Aktins wurden die Deckgläschen mit jeweils 25 µl Phalloidinfärbelösung (5 µg/ml FITC-Phalloidin in 1xPBS) vollständig bedeckt und in einer abgedunkelten feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS schloss sich die DNA-Färbung an.

4.4.2 DNA-Färbung und Eindecken der Präparate

Durch die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) werden Zellkerne und Bakterien angefärbt. PI lagert sich in die DNA-Helix ein und färbt diese rot. Auf jedes Deckgläschen wurden 25 µl der Färbelösung (5 µg/ml PI in 1xPBS) aufgetragen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten feuchten Kammer wurden die Deckgläschen dreimalig mit 1xPBS gespült und anschließend eingedeckt. Hierzu wurden die Deckgläschen zunächst in A. bidest. gespült und bei 37 °C im Dunkeln für 10 Minuten getrocknet.

Das Eindecken der Präparate erfolgte mit der Zellseite nach unten mit 5 µl MobiGLOW auf Objektträgern. MobiGLOW wurde verwendet, um die Zellen permanent zu fixieren und ein Ausbleichen der Präparate durch UV-Strahlung abzuschwächen. Die Ränder wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Nagellack vorsichtig abgedichtet. Die Präparate wurden bis zur Auswertung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

4.5 Begriffsbestimmungen

Als Kolonie wird jedes Bakterium definiert, das nach Ausplattieren der Proben auf den entsprechenden Agarplatten und 12- bis 24-stündiger Inkubation der Platten bei 37 °C sichtbar war. Jede Kolonie, die auf CHROMAgar-Orientierungsplatten nach 12- bis 24-stündiger Inkubation bei 37 °C pink gewachsen war, wird als colifome Kolonie bezeichnet. Jede coliforme Kolonie, die biochemisch mindestens sechs von sieben für *E. coli*-typische Stoffwechselreaktionen (aerober und anaerober Glukoseabbau unter Gasbildung ohne H₂S-Bildung, Lysinabbau, Indolbildung, keine Harnstoff- und Citratverwertung) aufwies, wird in dieser Arbeit als *E. coli*-Isolat definiert. Jeder Klon hingegen ist die Summe aller *E. coli*-Isolate, deren durch PFGE oder RAPD-PCR ermittelte Bandenmuster nicht

voneinander abweichen. Ein dominanter Klon ist ein Klon, der mehr als 50 % der Isolate einer Probe repräsentiert, wohingegen ein *minor*-Klon maximal 10 % der Isolate einer Probe umfasst.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene werden in Virulenzgene (VGs) und virulenzassoziierte Gene (VAGs) unterschieden. Ein Virulenzgen (VG) ist ein Gen, das eindeutig an der bakteriellen Pathogenese einer Erkrankung beteiligt ist. Zu den in dieser Arbeit untersuchten, für intestinal schweinepathogene *E. coli* typischen VGs zählen *stx2e* (Shiga-Toxin2e-Gen), *faeG*, *fanA*, *fasA*, *fedA*, *fimF41a* (für die Fimbrien F4, F5, F6, F18 and F41 kodierende Gene), *est Ia*, *est II* (für die hitzestabilen Enterotoxine I und II kodierende Gene), *eltB* (für das hitzelabile Enterotoxin I kodierendes Gen), *paa* (für den „*porcine adherence factor*“ kodierendes Gen), *aidA-I* (für das „*adhesin involved in diffuse adhesion I*“ kodierende Gen) und *sepA* (für „*secretion of E. coli proteins*“ kodierendes Gen). Ein virulenzassoziiertes Gen (VAG) hingegen ist ein Gen, dem eine gewisse Bedeutung in der Pathogenese von bakteriellen Erkrankungen eingeräumt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich 33 VAGs untersucht, die für extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC) typisch sind [63]. Eine Ausnahme dieser strikten Einteilung in Virulenzgene und virulenzassoziierte Gene stellt das Gen *astA* dar, welches in der Literatur beiden Gruppen zugeordnet wird. Auch innerhalb der vorliegenden Arbeit wird das Vorkommen von *astA* sowohl im Zusammenhang mit Virulenzgenen als auch mit virulenzassoziierten Genen untersucht und diskutiert.

4.6 Statistische Methoden

Die Daten aus der Pulsfeld-Gelelektrophorese wurden mithilfe der Software *BioNumerics* (Version 4.5; *Applied Maths*, Sint-Martens-Latem, Belgien) ausgewertet. Die Daten aus den Adhäsionsversuchen wurden aus drei voneinander unabhängigen Tests erhoben und als logarithmierte Mittelwerte aus den drei einzelnen Tests präsentiert.

Statistisch wurden die Daten mit der Software *Excel 2003* (Microsoft Cooperation, Redmont, USA) und *SPSS 16.0* sowie *17.0* (SPSS, Chicago, USA) ausgewertet. Alle Balken-, Linien- und Kreisdiagramme sowie die Boxplot-Darstellungen wurden mit *SPSS 16.0* sowie *17.0* erstellt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test diente zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung. Signifikante Unterschiede wurden bei normalverteilten Daten mit dem T-Test und bei nicht normal verteilten Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft.

Der exakte Test nach Fischer wurde zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede bei der Häufigkeit der VAGs in Bezug auf die ECoR-Gruppen eingesetzt. Das Signifikanzniveau lag bei 95 % (P-Wert < 0,05). Korrelationen zwischen den erhobenen Daten wurden mithilfe des Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt.

Zur Bestimmung der Diversität wurde der Diversitätsindex nach Simpson (D_i) benutzt [95]. Er wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$D_i = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

N bezeichnet die Anzahl der betrachteten Isolate, s die Anzahl gefundener Klone und n_j die Anzahl der Isolate, die zum Klon j gehören.

5. Ergebnisse

Zur besseren Übersicht ist der Abschnitt „Ergebnisse“ in zwei Unterabschnitte gegliedert. Zunächst werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Diversität von jeweils 30 *E. coli*-Isolaten aus dem Darm von 21 Wildschweinen dargestellt. Der zweite Teil befasst sich mit den Ergebnissen der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie den Zelltestversuchen der 102 *E. coli*-Isolate aus Wildschweinen, bei denen jedes *E. coli*-Isolat aus einem anderen Wildschwein stammt.

5.1 Untersuchungen zur Diversität

Zur Betrachtung der Diversität von *E. coli*-Populationen im Darm von Wildschweinen wurden *E. coli*-Isolate aus dem Jejunum, dem Ileum und dem Kolon von 21 Tieren untersucht. Nach Erstanzucht auf MacConkey-Platten konnten außer bei einem Tier zehn *E. coli*-Isolate pro Darmabschnitt zunächst auf CHROMagar-Orientierungsplatten und GASSNER-Platten ausgestrichen werden. Nach Identifikation der Klone mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte jeder Klon durch ein repräsentatives Isolat biochemisch eindeutig als *E. coli* identifiziert werden. Aus dem Jejunuminhalt eines Tieres konnten nur vier Kolonien isoliert werden. Es standen demnach 624 *E. coli*-Isolate für die Diversitätsuntersuchungen zur Verfügung.

5.1.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese/RAPD-PCR

Die insgesamt 624 *E. coli*-Isolate wurden 105 Klonen zugeordnet. Durchschnittlich wies jedes Wildschwein $5,14 \pm 3,53$ verschiedene Klone auf, bei einem Minimum von einem Klon pro Tier bis hin zu einem Maximum von 16 Klonen pro Tier. Aus dem Jejunum wurden im Durchschnitt $2,19 \pm 1,47$ Klone, aus dem Ileum $2,24 \pm 1,41$ Klone und aus dem Kolon $3,00 \pm 2,05$ Klone pro Tier isoliert. Unten stehende Abbildung zeigt das typische Bandenmuster der einzelnen *E. coli*-Isolate nach Pulsfeld-Gelelektrophorese mit dem Restriktionsenzym *Xba*I (Abb. 5).

Beispielhaft sind 28 *E. coli*-Isolate aus dem Darm der Wildschweine 15 und 20 abgebildet. Die Bandenmuster der Proben in den Laufspuren 7 bis 16 von *E. coli*-Isolaten aus dem Kolon von Wildschwein 20 sind identisch und zeigen, dass alle zehn Isolate den gleichen Klon repräsentieren, der zudem auch im Ileum detektiert werden konnte (Laufspuren 18, 22 und 24). Die restlichen sieben Isolate aus dem Ileum von Wildschwein 20 (Laufspuren 17, 19-21,

23, 25, 26) sind ebenfalls Isolate, die einen Klon repräsentieren, so dass im Ileum dieses Tieres zwei verschiedene *E. coli*-Stämme nachgewiesen werden konnten.

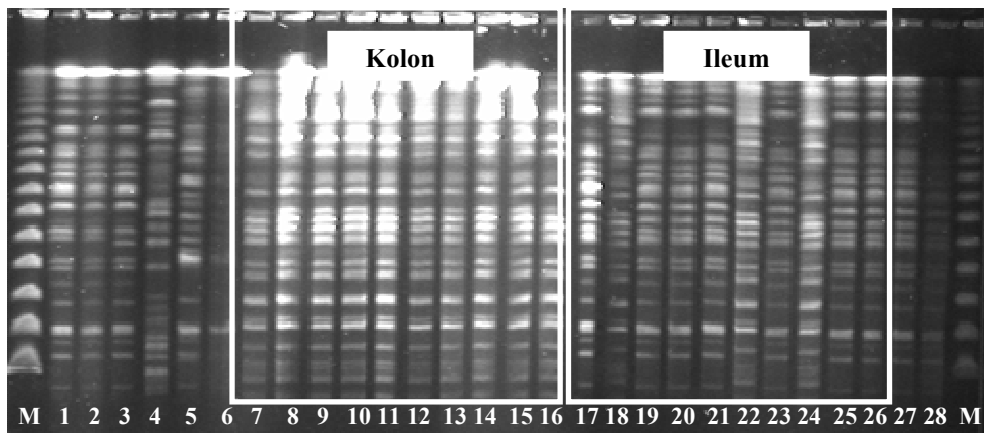


Abb. 5 Elektropherogramm zur Zuordnung von *E. coli*-Isolaten zu bestimmten Klonen.

M: Marker
Proben 1-6: Wildschwein 15, Isolate 5 bis 10 aus dem Jejunum;
Proben 7-16: Wildschwein 20, Isolate 1 bis 10 aus dem Kolon;
Proben 17-26: Wildschwein 20, Isolate 1 bis 10 aus dem Ileum;
Proben 27 bis 28: Wildschwein 20, Isolate 1 und 2 aus dem Jejunum
 Deutlich zu erkennen ist hier z.B. bei Wildschwein 20: Alle zehn Isolate aus dem Kolon gehören zu einem Klon. Es existieren zwei Klone im Ileum, einer dieser Klone besiedelte Kolon und Ileum.

5.1.2 Diversitätsindex

Der Diversitätsindex nach Simpson ermöglicht es, die Diversität von Populationen unabhängig von der Zahl der betrachteten Isolate miteinander zu vergleichen. Er liegt bei „0“ falls pro Darmabschnitt nur ein Klon nachweisbar ist bzw. bei „1“, wenn zehn verschiedene Klone pro Darmabschnitt nachgewiesen worden wären. Der Diversitätsindex (D_i) wurde pro Tier für den gesamten Darm sowie für die einzelnen Darmabschnitte berechnet. Für die Diversität im Jejunum wurde ein D_i von $0,36 \pm 0,3$ errechnet, für das Ileum ein $D_i = 0,36 \pm 0,3$. Im Kolon war die Diversität höher ($D_i = 0,45 \pm 0,35$). Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Durchschnittlich lag der Diversitätsindex für den gesamten untersuchten Darmbereich bei $0,56 \pm 0,27$ und damit aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der einzelnen Klone auf die Darmabschnitte höher als die Diversitätsindizes von Jejunum, Ileum und Kolon (siehe Formel in Kapitel 4.6). Genaue Angaben zu den einzelnen Wildschweinen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 11 Anzahl der Klone und Diversitätsindizes der *E. coli*-Populationen von 21 Wildschweinen

		Wildschwein																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	MW
Anzahl der Klone	gesamter Darm	3	2	4	7	8	3	16	6	1	1	7	7	7	9	3	3	4	7	2	2	3	5
	Jejunum	2	1	1	2	2	1	4	2	1	1	6	5	1	4	2	1	3	3	1	1	2	2
	Ileum	1	2	1	5	2	1	4	2	1	1	2	5	4	2	2	2	1	6	2	2	1	2
	Kolon	2	2	4	4	5	4	9	5	1	1	1	2	6	3	2	3	1	3	1	1	3	3
Di nach Simpson	gesamter Darm	0,58	0,13	0,60	0,79	0,83	0,50	0,90	0,73	0,00	0,00	0,69	0,73	0,79	0,86	0,54	0,54	0,53	0,86	0,13	0,54	0,54	0,56
	Jejunum	0,50	0,00	0,00	0,20	0,20	0,00	0,53	0,53	0,00	0,00	0,89	0,80	0,56	0,64	0,69	0,20	0,69	0,71	0,00	0,00	0,53	0,36
	Ileum	0,00	0,20	0,00	0,76	0,56	0,00	0,53	0,53	0,00	0,00	0,20	0,76	0,76	0,36	0,56	0,53	0,00	0,91	0,36	0,60	0,00	0,36
	Kolon	0,36	0,20	0,80	0,80	0,76	0,69	0,98	0,82	0,00	0,00	0,00	0,20	0,93	0,64	0,20	0,73	0,00	0,64	0,00	0,00	0,62	0,45

Di = Diversitätsindex nach Simpson

MW = Mittelwert

5.1.3 Virulenzgenprofil

Alle 105 detektierten *E. coli*-Klone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von Virulenzgenen überprüft, die für porcine intestinal-pathogene *E. coli* charakteristisch sind. Dazu gehören die für Adhäsine kodierenden Gene *fedA*, *faeG*, *fanA*, *fasA*, *fimF41a*, *paa* und *aidA-I*, das Shiga-Toxigen *stx2e*, die Gene für die Enterotoxine *est Ia*, *est II*, *eltB* und *astA* sowie *sepA*, welches für das „secretion of *E. coli* proteins“ kodiert.

53,7 % der untersuchten *E. coli*-Klone besaßen mindestens ein Virulenzgen. *Est II* konnte in einem (0,96 %) Klon und *eltB* in drei Klonen aus zwei Tieren (2,88 %) nachgewiesen werden. *Paa* trat bei drei Klonen in drei Tieren auf (2,88 %) und *aidA-I* bei fünf Klonen aus fünf Tieren. Mit 45,19 % der Klone (47 Klone in 19 Tieren) war *astA* am häufigsten vertreten. Als Kombinationen traten *astA+eltB*, *astA+aidA-I*, *astA+est II+eltB* sowie *eltB+paa* auf.

5.1.4 Phylogenetische Zuordnung (ECoR-PCR)

Aus jedem der drei Darmabschnitte konnten *E. coli*-Klone aller vier ECoR-Gruppen isoliert werden. Im Jejunum gehörten 31,8 % der Klone der Gruppe A, 11,4 % der Gruppe B1, 38,6 % der Gruppe B2 und der 18,2 % der Gruppe D an. Im Ileum repräsentierten 27,1 % der Klone die Gruppe A, 10,4 % der Klone die Gruppe B1, 35,4 % der Klone die Gruppe B2 und 27,1 % der Klone die Gruppe D. *E. coli* aus dem Kolon hingegen waren fast zu gleichen Teilen innerhalb der ECoR-Gruppen vertreten: Sie gehörten zu 22,3 % der Gruppe A und zu jeweils 25,9 % den Gruppen B1, B2 und D an. Abb. 6 verdeutlicht, dass sowohl im Jejunum als auch im Ileum deutlich weniger *E. coli* zur Gruppe B1 gehörten als im Kolon.

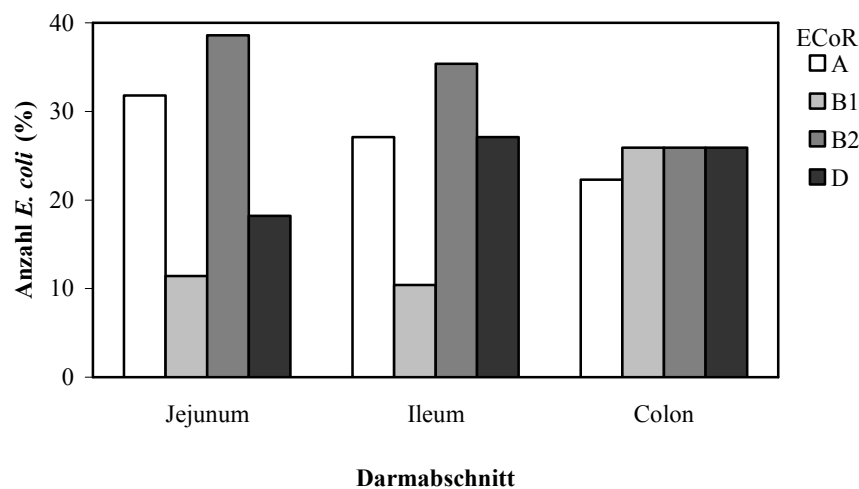


Abb. 6 Prozentualer Anteil der ECoR-Gruppen* im Jejunum, Ileum und Kolon der untersuchten Wildschweine
*Der Nachweis der ECoR-Gruppen wurde mittels PCR nach Clermont et al. erbracht (133).

Mitglieder jeder ECoR-Gruppe konnten einzelne Darmabschnitte dominieren, wobei jedoch in jeweils zwei verschiedenen Wildschweinen nur Klone der Gruppen A und B2 auftraten. In Korrelation zu den Virulenzgenen fiel auf, dass ECoR-Gruppe B2-Klone seltener (35,7 %) Virulenzgene aufwiesen als Klone der ECoR-Gruppe B1 (54,5 %) oder ECoR-Gruppe A (75 %). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

5.2 Geno- und phänotypische Charakterisierung von 102 *E. coli*-Isolaten aus dem Darm von Wildschweinen

5.2.1 Ausschluss identischer *E. coli*-Isolate durch Makrorestriktionsanalyse

Aus dem Darm von 119 im Zeitraum von November 2006 bis Dezember 2008 erlegten Wildschweinen konnten coliforme Bakterienkolonien, d. h. auf CHROMAgar-Orientierungsplatten pinkfarbene wachsende Bakterienkolonien gewonnen werden. Pro Tier wurde eine zufällig ausgewählte coliforme Kolonie subkultiviert. Nach Gewinnung der DNA aus diesen Kolonien und anschließendem Restriktionsverdau der DNA ergaben sich 102 verschiedene genetische Muster. Sechs dieser 102 Klone wurden durch jeweils zwei Bakterienisolate repräsentiert, zwei Klone durch jeweils drei Isolate und je ein Klon durch vier bzw. fünf Bakterienisolate. Pro Klon wurde ein repräsentatives Isolat in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

In Abb. 7 ist stellvertretend für die 119 untersuchten coliformen Kolonien ein Pulsfeld-Gelelektropherogramm der *E. coli*-Isolate aus dem Darm der Wildschweine 37 bis 43 sowie 52 und 53 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist hier z.B., dass die Isolate aus den Wildschweinen 37 und 38 (Laufspuren 2 und 3) Vertreter desselben Klons darstellen. Ebenso wurden aus dem Kolon der Wildschweine 40 und 41 (Laufspuren 5 und 6) bzw. aus dem Kolon der Wildschweine 52 und 53 (Laufspuren 9 und 10) Isolate des jeweils gleichen Klons gewonnen.

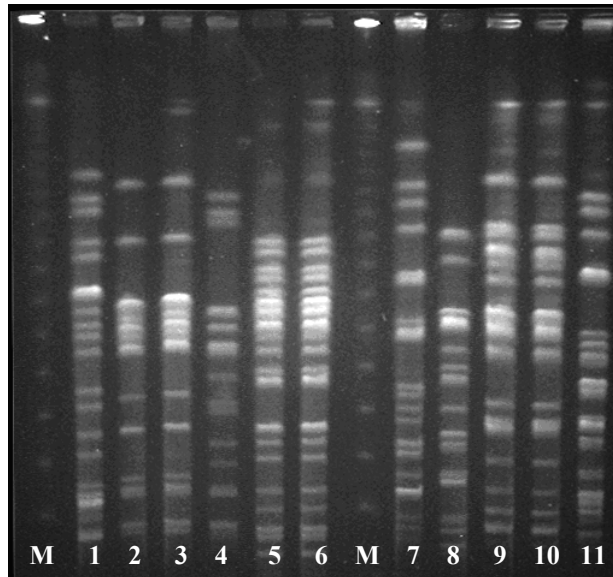


Abb. 7 Elektropherogramm zum Ausschluss identischer *E. coli*-Isolate aus dem Kolon verschiedener Wildschweine

M: Marker;

Probe 1: EDL 993 (Kontrollstamm);

Probe 2-8: *E. coli*-Isolate aus dem Kolon der Wildschweine 37 bis 43;

Probe 9-11: *E. coli*-Isolate aus dem Kolon der Wildschweine 52 bis 54

5.2.2 Biochemische Identifizierung

Um die 102 detektierten coliformen Kolonien eindeutig als *E. coli* zu identifizieren, wurden diese einer biochemischen Identifizierung durch die so genannte „Bunte Reihe“ unterzogen. Dabei wurden sieben Reaktionen im Kliger- und LIM-Agar sowie im Harnstoff- und Citratröhrchen untersucht. Toleriert wurde maximal eine Abweichung von den für *E. coli* typischen Normwerten.

100 (98 %) Isolate konnten Laktose aerob verstoffwechseln. Zur anaeroben Glykolyse mit deutlicher CO₂-Bildung waren 101 (99 %) der Kolonien in der Lage, wohingegen kein Isolat H₂S bildete. Lysin konnte von 100 (99 %) der coliformen Kolonien decarboxyliert werden. Zudem waren 98 (96 %) der Kolonien in der Lage, Indol zu bilden. Harnstoff konnte von keinem und Citrat nur von einem coliformen Isolat als Substrat genutzt werden. Die Resultate von 92 (90,2 %) coliformen Kolonien stimmten mit den erwarteten Normwerten überein. Die zehn (9,8 %) übrigen coliformen Kolonien wichen in genau einem Merkmal von den Normwerten ab (in Tab. 12 dargestellt). Insgesamt wurden daher alle 102 coliformen Kolonien biochemisch als *E. coli* identifiziert.

Tab. 12 „Bunte Reihe“ ausgewählter *E. coli*-Stämme

IMT-Nummer	Lakt	Gly _{anae}	H ₂ S	Lysin	Indol	Urea	Citrat
16431	1	1	0	1	0	0	0
16433	1	1	0	1	0	0	0
16459	1	1	0	1	1	0	1
16468	1	1	0	0	1	0	0
16470	0	1	0	1	1	0	0
16473	0	1	0	1	1	0	0
16476	1	0	0	1	1	0	0
16477	1	1	0	0	1	0	0
16489	1	1	0	1	0	0	0
16491	1	1	0	1	0	0	0

„1“ = positiv; „0“ = negativ;

Lakt = Laktoseverwertung; Gly_{anae} = anaerobe Glykolyse mit Gasbildung;

Lysin = Lysindecaboxylierung; Indol = Indolbildung;

Urea = Harnstoffverwertung;

Citrat = Citratverwertung.

5.2.3 Phylogenetische Zuordnung der *E. coli* nach Clermont et al. (ECoR-PCR)

Die ECoR-PCR ermöglichte die Einteilung der untersuchten *E. coli* in Hinblick auf deren Zugehörigkeit zu einer der vier phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D. Es waren alle vier phylogenetischen Gruppen vertreten. Jeweils 31 (30,4 %) *E. coli*-Isolate gehörten zu den Gruppen A und B1, wohingegen aus Gruppe B2 24 (23,5 %) *E. coli* stammten und 16 (15,7 %) in die Gruppe D eingeordnet wurden.

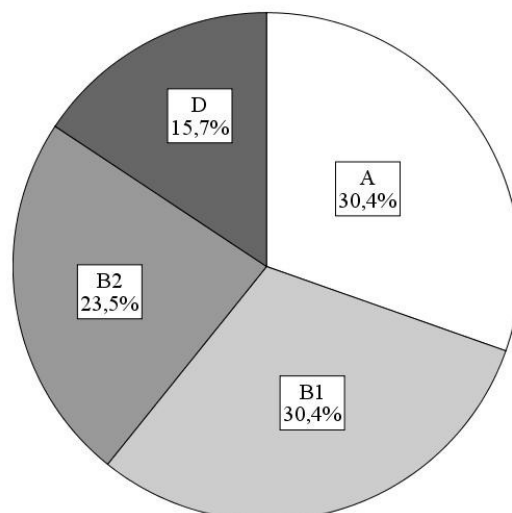


Abb. 8 Prozentuale Verteilung der untersuchten 102 *E. coli* von 102 Wildschweinen auf die vier ECoR-Gruppen* A, B1, B2 und D

*Die EcoR-Gruppenzugehörigkeit wurde mittels EcoR-PCR festgestellt.

5.2.4 Lebensraum, Alter und Geschlecht der Wildschweine

Die isolierten und für die weitere Charakterisierung verwendeten *E. coli* stammen aus 102 Wildschweinen. Mit 69 beprobten Wildschweinen (67,6 %) stammt der größte Anteil der *E. coli* aus der Region „Lausitz“, die die Jagdgebiete Casel (Drebkau), Groß Liebitz, Lauchhammer, Milstrich, Nochten, Schwarzkollm, Sollschwitz, Spreetal und Welzow umfasst. Der Großraum „Berlin“ umfasst Jagdbezirke in Berlin (Grunewald) und dem Berliner Umland. Er beinhaltet 22 (21,6 %) Wildschweine. *E. coli*-Isolate aus Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern sind mit zehn (9,8 %) bzw. einem (1 %) Wildschwein nur vereinzelt vertreten.

Altersangaben waren von 55 Wildschweinen (53,9 %) und Angaben zum Geschlecht von 48 Wildschweinen (47,1 %) verfügbar. In die Altersklasse I (Tiere jünger als ein Jahr) entfielen 31 (56,4 %), in die Altersklasse II (ein bis zwei Jahre) 17 (30,9%) und in die Altersklasse III (älter als zwei Jahre) sieben (12,7 %) Wildschweine mit evaluierbaren Daten. Von den 48 Wildschweinen mit Angaben zum Geschlecht waren 26 (54,2 %) Wildschweine männlich und 22 (45,8 %) weiblich. Die erhobenen Daten sind in Tab. 13 zusammenfassend dargestellt.

5.2.4.1 Herkunft der Wildschweine

Lausitz: Von den 69 Wildschweinen aus der Region „Lausitz“ waren 25 (36,2 %) männlich, 18 (26,1 %) weiblich und zu 26 Tieren (37,7 %) waren keine diesbezüglichen Angaben verfügbar. Der größte Teil der Tiere war der Altersklasse I (30 Wildschweine bzw. 43,5 %) angehörig. Nach phylogenetischer Zuordnung mittels ECoR-Gruppierung gehörten 30,4 % der isolierten *E. coli* der Gruppe A, 29,0 % der Gruppe B1, 18,9 % der Gruppe B2 und 21,7 % der Gruppe D an.

Berlin: Aus der Region „Berlin“ fehlen die Daten zum Alter bzw. zum Geschlecht bei 63,3 % bzw. 81,8 % der Wildschweine. Der ECoR-Gruppe A waren 36,4 % der *E. coli* zuzuteilen, der Gruppe B1 22,7 % und der Gruppe B2 40,9 %, während kein Isolat aus Gruppe D gefunden wurde.

Thüringen: Zu den zehn aus Thüringen stammenden Wildschweinen waren keine Angaben zu Alter und Geschlecht verfügbar. Zu je einem Fünftel gehörten die isolierten *E. coli* den Gruppen A und B2 an, während die restlichen 60 % der Gruppe B1 zugehörig waren.

Mecklenburg-Vorpommern: Das Wildschwein aus Mecklenburg-Vorpommern war weiblich und zum Zeitpunkt der Jagd ein bis zwei Jahre alt. Das von diesem Tier isolierte *E. coli*-Bakterium wurde der Gruppe D zugeordnet (Abb. 9).

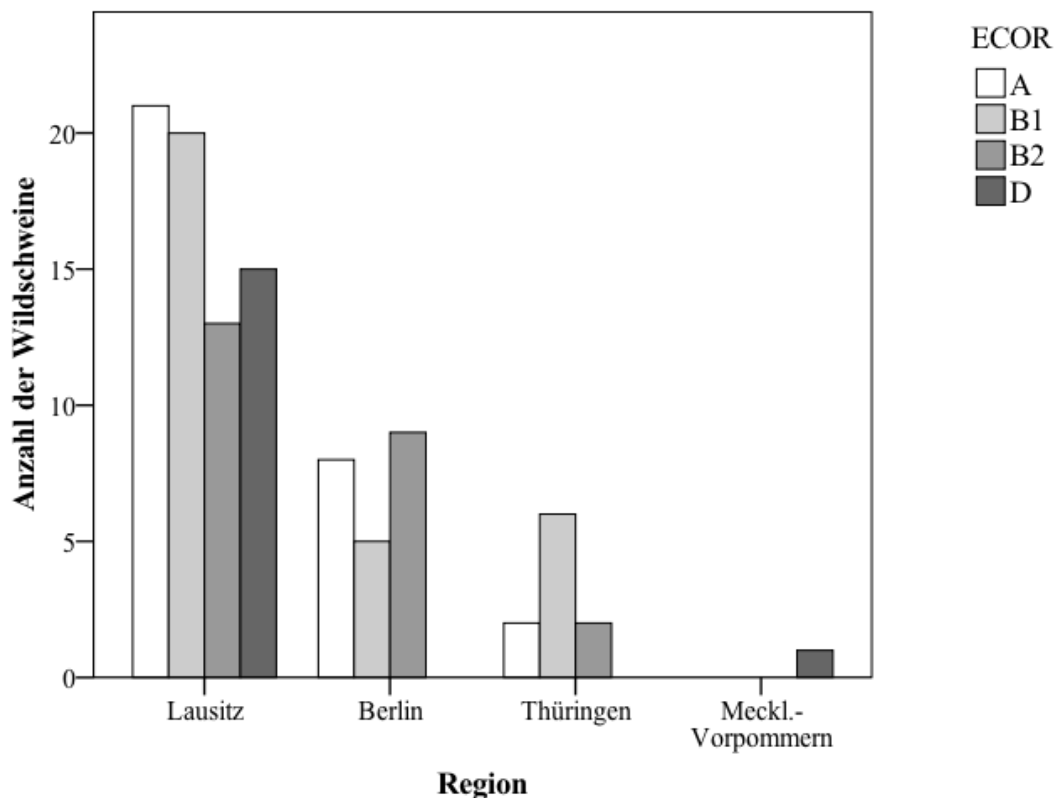


Abb. 9 Absolutverteilung des Vorkommens von 102 porzinen intestinalen *E. coli* der vier ECoR-Gruppen hinsichtlich der Herkunftsregion der 102 Wildschweine

5.2.4.2 Alter der Wildschweine

Altersklasse I: Wildschweine der Altersklasse I stammten zu 96,8 % aus der Jagdregion „Lausitz“ und nur eines aus der Region „Berlin“. 19 der 31 Tiere waren männlichen, neun weiblichen Geschlechts. Zu drei Tieren fehlten die betreffenden Angaben. Die ECoR-Gruppen A und B1 waren jeweils mit elf (je 35,5 %), Gruppe B2 mit drei (9,6 %) und Gruppe D mit sechs (19,4 %) *E. coli*-Isolaten vertreten.

Altersklasse II: Die 17 zur Altersklasse II gehörenden Wildschweine setzten sich aus vier (23,5 %) männlichen und neun (53 %) weiblichen Tieren zusammen. Von vier Tieren fehlten die Angaben zum Geschlecht. Neun Wildschweine stammten aus der Region „Lausitz“, fünf aus der Region „Berlin“ und eines aus Mecklenburg-Vorpommern. Mit 41,2 % trat die ECoR-Gruppe A am häufigsten auf, gefolgt von den Gruppen D (29,4 %), B2 (17,6 %) und B1 (11,8 %).

Altersklasse III: Zwei der sieben Tiere der Altersklasse III waren männlichen und vier weiblichen Geschlechts. Alle stammten aus der Region „Lausitz“. Jeweils zwei (28,6 %)

E. coli waren den ECoR-Gruppen A, B1 und B2 zuzuordnen und eines (14,2 %) der Gruppe D.

5.2.4.3 Geschlecht der Wildschweine

Männliche Tiere: Die 26 männlichen Wildschweinen stammten bis auf ein Tier, das in der Region „Berlin“ erlegt worden war, aus der Region „Lausitz“. Der größte Teil der erlegten männlichen Wildschweine war zum Zeitpunkt der Jagd unter einem Jahr alt (73,3 %). Elf (42,3 %) *E. coli*-Isolate waren der ECoR-Gruppe A, sieben (26,9 %) der Gruppe B1 und acht (30,8 %) der Gruppe D zugehörig.

Weibliche Tiere: Von den 22 weiblichen Tieren stammten 18 (81,8 %) aus der Region „Lausitz“, drei (13,6 %) aus der Region „Berlin“ und eines (4,6 %) aus Mecklenburg-Vorpommern. Die Altersklassen I und II waren mit 40,9 % gleich stark vertreten, wohingegen vier (18,2 %) Tiere über zwei Jahre alt waren. ECoR-Gruppe A stellte mit 31,8 % den größten Anteil isolierter *E. coli* dar. Es folgten Gruppe B2 (27,3 %), Gruppe B1 (22,7 %) und Gruppe D (18,2 %).

Tab. 13 102 intestinale *E. coli*-Isolate und Angaben zu Herkunft, Geschlecht und Alter der jeweiligen Wildschweine

<i>E. coli</i> -Isolat		Wildschwein			<i>E. coli</i> -Isolat		Wildschwein		
IMT- Nummer	ECoR	Region	Ge- schlecht	A.- Kl. ¹	IMT- Nummer	ECoR	Region	Ge- schlecht	A.- Kl. ¹
13127	A	Lausitz	Männlich	I	16415	B1	Lausitz	männlich	I
16448	A	Lausitz	Männlich	I	16455	B1	Lausitz	männlich	I
16454	A	Lausitz	Männlich	I	16456	B1	Lausitz	männlich	I
16457	A	Lausitz	Männlich	I	16495	B1	Lausitz	männlich	I
16492	A	Lausitz	Männlich	I	16496	B1	Lausitz	männlich	I
16493	A	Lausitz	Männlich	I	16498	B1	Lausitz	männlich	I
16442	A	Lausitz	Männlich	II	16500	B1	Lausitz	männlich	I
16443	A	Lausitz	Männlich	II	16458	B1	Lausitz	weiblich	I
16447	A	Lausitz	Männlich	II	16497	B1	Lausitz	weiblich	I
16501	A	Lausitz	Männlich	III	16499	B1	Lausitz	weiblich	I
13100	A	Lausitz	Weiblich	I	16469	B1	Lausitz	weiblich	III
16451	A	Lausitz	Weiblich	I	16488	B1	Lausitz	k.A.	I
16465	A	Lausitz	Weiblich	I	16471	B1	Lausitz	k.A.	III
16467	A	Lausitz	Weiblich	I	16425	B1	Lausitz	k.A.	k.A.
13122	A	Lausitz	Weiblich	II	16431	B1	Lausitz	k.A.	k.A.
16446	A	Lausitz	Weiblich	II	16482	B1	Lausitz	k.A.	k.A.
16461	A	Lausitz	Weiblich	III	16483	B1	Lausitz	k.A.	k.A.
16466	A	Lausitz	k.A. ²	I	16484	B1	Lausitz	k.A.	k.A.
16426	A	Lausitz	k.A.	k.A.	16485	B1	Lausitz	k.A.	k.A.
16486	A	Lausitz	k.A.	k.A.	16487	B1	Lausitz	k.A.	k.A.
16502	A	Lausitz	k.A.	k.A.	14233	B1	Berlin	weiblich	I
13109	A	Berlin	Männlich	k.A.	16418	B1	Berlin	k.A.	II
16440	A	Berlin	k.A.	I	16416	B1	Berlin	k.A.	k.A.
16438	A	Berlin	k.A.	II	16460	B1	Berlin	k.A.	k.A.

<i>E. coli</i> -Isolat		Wildschwein		
IMT- Nummer	ECoR	Region	Ge- schlecht	A.- Kl. ¹
16417	A	Berlin	k.A.	k.A.
16473	A	Berlin	k.A.	k.A.
16475	A	Berlin	k.A.	k.A.
16476	A	Berlin	k.A.	k.A.
16481	A	Berlin	k.A.	k.A.
16432	A	Thür.	k.A.	k.A.
16433	A	Thür.	k.A.	k.A.
16463	B2	Lausitz	Weiblich	I
16464	B2	Lausitz	Weiblich	I
16470	B2	Lausitz	Weiblich	III
16462	B2	Lausitz	Weiblich	III
16419	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16420	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16421	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16422	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16423	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16424	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16427	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16428	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
16490	B2	Lausitz	k.A.	k.A.
14232	B2	Berlin	Weiblich	II
14234	B2	Berlin	Weiblich	II
16439	B2	Berlin	k.A.	I
16437	B2	Berlin	k.A.	II
16472	B2	Berlin	k.A.	k.A.
16474	B2	Berlin	k.A.	k.A.
16477	B2	Berlin	k.A.	k.A.
16478	B2	Berlin	k.A.	k.A.
16480	B2	Berlin	k.A.	k.A.
16434	B2	Thür.	k.A.	k.A.
16435	B2	Thür.	k.A.	k.A.

<i>E. coli</i> -Isolat		Wildschwein		
IMT- Nummer	ECoR	Region	Ge- schlecht	A.- Kl. ¹
16479	B1	Berlin	k.A.	k.A.
16436	B1	Thür. ⁴	k.A.	k.A.
14227	B1	Thür.	k.A.	k.A.
14228	B1	Thür.	k.A.	k.A.
14229	B1	Thür.	k.A.	k.A.
14230	B1	Thür.	k.A.	k.A.
14231	B1	Thür.	k.A.	k.A.
16412	D	Lausitz	männlich	I
16414	D	Lausitz	männlich	I
16450	D	Lausitz	männlich	I
16452	D	Lausitz	männlich	I
16453	D	Lausitz	männlich	I
16494	D	Lausitz	männlich	I
16444	D	Lausitz	männlich	II
16468	D	Lausitz	männlich	III
16441	D	Lausitz	weiblich	II
16445	D	Lausitz	weiblich	II
16449	D	Lausitz	weiblich	II
16429	D	Lausitz	k.A.	k.A.
16430	D	Lausitz	k.A.	k.A.
16489	D	Lausitz	k.A.	k.A.
16491	D	Lausitz	k.A.	k.A.
16459	D	M.-Po. ³	weiblich	II

1 = Altersklasse;

2 = keine Angabe;

3 = Mecklenburg-Vorpommern;

4 = Thüringen.

5.2.5 Hämolyse und Beweglichkeit der isolierten *E. coli*-Stämme

Auf Schafblutagarplatten zeigten drei (2,9 %) *E. coli*-Stämme eine Hämolyse. Alle Hämolysepositiven *E. coli* wurden aus Wildschweinen der Region „Berlin“ isoliert.

16 (15,7 %) *E. coli* waren auf Weichagarplatten unbeweglich. Die restlichen 88 (84,3 %) *E. coli* waren geringgradig (38 *E. coli*, 37,3 %), mittelgradig (21 *E. coli*, 20,5 %) oder hochgradig (27 *E. coli*, 26,5 %) beweglich. Der Anteil beweglicher *E. coli*-Stämme lag – unabhängig von der ECoR-Zuordnung – in jeder der vier phylogenetischen Gruppen zwischen 83,3 % und 87,5 %, der Anteil unbeweglicher *E. coli* zwischen 12,5 % und 16,7 %.

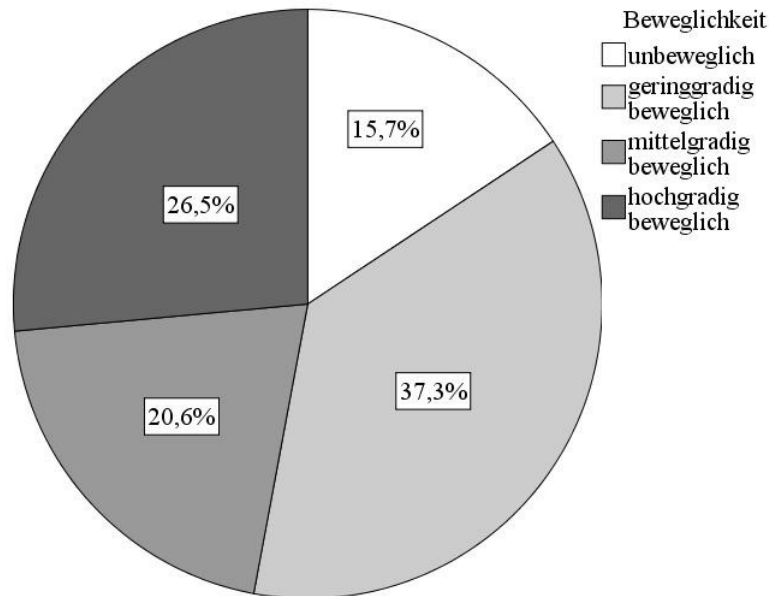


Abb. 10 Prozentuale Verteilung von 102 porzinen intestinalen *E. coli*-Stämme hinsichtlich ihrer Beweglichkeit auf Weichagarplatten

5.2.6 Vorkommen von Virulenzgenen (VGs) und virulenzassoziierten Genen (VAGs)

Das Vorkommen von Virulenzgenen und virulenzassoziierten Genen wurde mittels PCR untersucht. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse unterteilt. Zunächst werden Daten zu Virulenzgenen, die typisch für intestinale schweinepathogene *E. coli*-Stämme sind, dargestellt. Danach werden die Resultate der Untersuchungen zu den – für ExPEC charakteristischen – virulenzassoziierten Genen beschrieben.

5.2.6.1 Virulenzgene intestinal-pathogener *E. coli*

Untersucht wurde das Vorkommen der Shiga-Toxingene *stx1*, *stx2* und das für schweinepathogene *E. coli* spezifische *stx2e* zum Nachweis von Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC) und das Vorkommen von *escV* und *bfp* zum Beleg für EPEC bzw. zur Unterscheidung zwischen typischen und atypischen enteropathogenen *E. coli* (EPEC). Außerdem wurde das Auftreten der für intestinal schweinepathogene *E. coli* spezifischen sechs Adhäsinogene *fedA* (F18-Fimbrie), *faeG* (F4-Fimbrie, K88-Fimbrie), *fanA* (F5-Fimbrie, K99-Fimbrie), *fasA* (F6-Fimbrie, P987-Fimbrie), *fimF41a* (F41-Fimbrie) und *paa* (Nicht-Fimbrien-Adhäsin) überprüft [56, 184]. Schließlich wurden die Gene für drei hitzestabile Enterotoxine (*est Ia*, *est II* und *astA*) sowie *eltB*, das ein hitzelabiles Enterotoxin kodiert, getestet. Zusätzlich wurde das Vorkommen der Gene *sepA* (für das „secretion of

E. coli proteins“ kodierende Gen) und *aidA-I* (Nicht-Fimbrien-Adhäsine), die beide nicht nur beim Schwein Teil des Virulenzpotentials von *E. coli* sind, untersucht.

Fast alle der oben genannten Virulenzgene waren innerhalb der untersuchten *E. coli*-Stämme nicht oder nur sporadisch vertreten. *Stx1*, *faeG*, *fanA*, *fasA*, *FimF41a* und *eltB* konnten in keinem *E. coli*-Stamm vorgefunden werden. Die Gene *est II* und *est Ia* konnten bei vier (3,9 %) bzw. drei (2,9 %) *E. coli*-Isolaten nachgewiesen werden, auch *stx2e* war in drei (2,9 %) Isolaten nachweisbar. *EscV* trat bei zwei (2 %) *E. coli*-Isolaten auf, wohingegen *fedA* und *bfp* nur in je einem *E. coli* auffindbar waren. Im Genom von jeweils fünf (4,9 %) *E. coli* konnten *aidA-I* und *sepA* nachgewiesen werden. Deutlich häufiger hingegen waren mit 26 (25,5 %) bzw. 40 (39,2 %) *E. coli paa*- bzw. *astA*-positive Isolate vertreten.

Insgesamt besaßen 65,7 % der untersuchten *E. coli*-Isolate mindestens eines der genannten Virulenzgene. Drei Isolate wiesen *stx2e* auf, das typisch für intestinale schweinepathogene STEC ist. Vier *E. coli* besaßen das für ETEC typische Gen *est II*. Außerdem hatten zwei Klone das für atypische EPEC spezifische Virulenzgenmuster *escV*-positiv und *bfp*-negativ. Mehrfach traten außerdem – wie Tab. 14 zu entnehmen ist – Kombinationen von zwei oder drei Virulenzgenen auf.

Tab. 14 18 porcine intestinale *E. coli*-Stämme, die mehr als ein Virulenzgen aufwiesen

IMT-Nummer	Virulenzgene	Hämolyse	ECoR	Pathotyp
14229	<i>stx2e, est Ia, sepA</i>	negativ	B1	STEC
14230	<i>stx2e, est Ia, sepA</i>	negativ	B1	STEC
14231	<i>stx2e, est Ia, sepA</i>	negativ	B1	STEC
16416	<i>est II, astA</i>	negativ	B1	ETEC
16471	<i>est II, astA</i>	negativ	B1	ETEC
14234	<i>escV, sepA, paa</i>	negativ	B2	aEPEC
16467	<i>escV, aidA-I</i>	negativ	A	aEPEC
16445	<i>fedA, paa</i>	negativ	D	k.A.
16461	<i>sepA, astA</i>	negativ	A	k.A.
16444	<i>aidA-I, paa</i>	negativ	D	k.A.
16436	<i>paa, astA</i>	negativ	B1	k.A.
16437	<i>paa, astA</i>	negativ	B2	k.A.
16447	<i>paa, astA</i>	negativ	A	k.A.
16449	<i>paa, astA</i>	negativ	D	k.A.
16450	<i>paa, astA</i>	negativ	D	k.A.
16451	<i>paa, astA</i>	negativ	A	k.A.
16456	<i>paa, astA</i>	negativ	B1	k.A.
16458	<i>paa, astA</i>	negativ	B1	k.A.

Untersuchte Virulenzgene: *stx1*, *stx2e*, *est I*, *est II*, *eltB*, *astA*, *fedA*, *faeG*, *fanA*, *fasA*, *fimF41a*, *paa*, *aidA-I*, *sepA*, *escV*, *bfp*

k. A. = keine Angabe

FAS-Test

Zum Nachweis der von EPEC auf Epithelzellen typischerweise hervorgerufenen A/E-Läsionen wurden die beiden *escV*-positiven *E. coli*-Stämme IMT 14234 und IMT 16467 durch den FAS-Tests mithilfe von IPEC-J2-Zellen untersucht. Bei beiden Stämmen konnte eine Aktinakkumulation unterhalb der ausgebildeten Mikrokolonie nachgewiesen werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von IPEC-J2-Zellen, die mit dem *E. coli*-Stamm IMT 16467 infiziert worden waren. In Abb. 11 sind die deutlich grün gefärbte Aktinakkumulation und in Abb. 12 die mit Propidiumiodid (PI) rot angefärbten Darmepithelzellkerne und *E. coli* erkennbar. Ein Übereinanderlegen beider Bilder (Abb. 13) verdeutlicht, dass die Aktinverdichtung unterhalb der Mikrokolonie liegt.

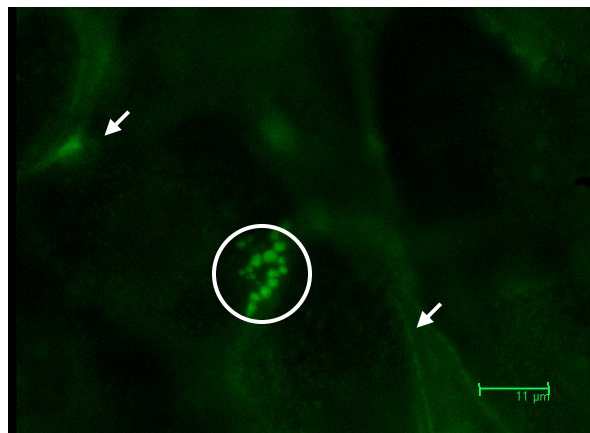


Abb. 11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Aktinfärbung (Farbstoff: FITC-Phalloidin) von IPEC-J2-Zellen, die mit dem *E. coli* IMT 16467 infiziert wurden
Weißer Kreis: grün angefärbte Aktinakkumulation;
Weiße Pfeile: grün angefärbte Aktinfilamente der Cytoskelette von IPEC-J2-Zellen

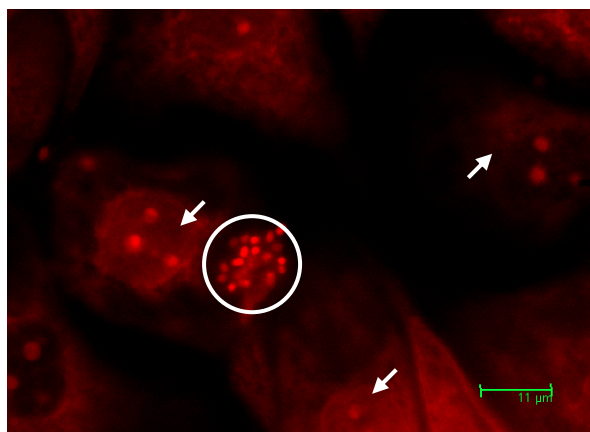


Abb. 12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DNA-Färbung (Farbstoff: Propidiumiodid) von IPEC-J2-Zellen, die mit dem *E. coli* IMT 16467 infiziert wurden
Weißer Kreis: rot angefärbte Bakterien;
Weißer Pfeil: rot angefärbte Zellkerne der IPEC-J2-Zellen

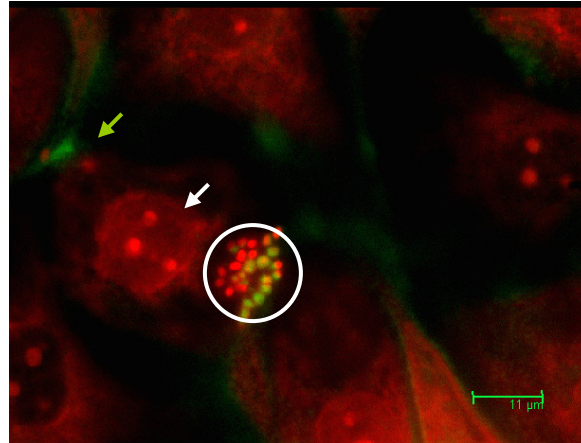


Abb. 13 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Aktin- und DNA-Färbung (Farbstoffe: FITC-Phalloidin und Propidiumiodid) von IPEC-J2-Zellen, die mit *E. coli* IMT 16467 infiziert wurden
Weißer Kreis: rot angefärbte Bakterien mit grün fluoreszierendem, akkumuliertem Aktin;
Weißer Pfeil: rot angefärbter Zellkern einer IPEC-J2-Zelle;
Grüner Pfeil: grün angefärbte Aktinfilamente des Cytoskeletts einer IPEC-J2-Zelle

5.2.6.2 ExPEC-typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs)

Die untersuchten Gene sowie die absolute und relative Verteilung innerhalb der 102 untersuchten *E. coli*-Isolate sind in Tab. 15 aufgelistet:

Tab. 15 Auflistung der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* nachgewiesenen, für ExPEC-typischen, virulenzassoziierten Gene (VAGs)

VAG	Kodierung für:	abs. Anzahl	rel. Anzahl
<i>afa/draB</i>	Adhäsion	0	0,0 %
<i>astA</i>	Toxin	40	39,2 %
<i>chuA</i>	Eisenaufnahmesystem	38	37,3 %
<i>cnf1/2</i>	Toxin	12	11,7 %
<i>crlA</i>	Adhäsion	90	88,2 %
<i>cvi/cva</i>	Protektin	6	5,9 %
<i>feoB</i>	Eisenaufnahmesystem	49	48,0 %
<i>fimC</i>	Adhäsion	102	100,0 %
<i>fyuA</i>	Eisenaufnahmesystem	29	28,4 %
<i>gimB</i>	Invasin	0	0,0 %
<i>hlyA</i>	Toxin	3	2,9 %
<i>hra</i>	Adhäsion	23	22,6 %
<i>ibeA</i>	Invasin	15	14,7 %
<i>iha</i>	Adhäsion	5	4,9 %
<i>ireA</i>	Eisenaufnahmesystem	3	2,9 %
<i>iroN</i>	Eisenaufnahmesystem	12	11,8 %
<i>irp2</i>	Eisenaufnahmesystem	20	19,6 %
<i>iss</i>	Protektin	3	2,9 %
<i>iucD</i>	Eisenaufnahmesystem	1	1,0 %
<i>kps</i>	Protektin	24	23,5 %
<i>malX</i>	Pathogenitätsinsel-Marker	15	14,7 %
<i>mat</i>	Adhäsion	47	46,1 %
<i>neuC</i>	Protektin	0	0,0 %
<i>ompA</i>	Protektin	102	100,0 %

VAG	Kodierung für:	abs. Anzahl	rel. Anzahl
<i>papC</i>	Adhäsın	1	1,0 %
<i>pic</i>	Protease	7	6,9 %
<i>sat</i>	Toxin	3	2,9 %
<i>sfa/foc</i>	Adhäsın	5	4,9 %
<i>sitD chr.</i>	Eisenaufnahmesystem	11	10,8 %
<i>sitD ep.</i>	Eisenaufnahmesystem	5	4,9 %
<i>tia</i>	Invasin	6	5,9 %
<i>traT</i>	Protektin	45	44,1 %
<i>tsh</i>	Adhäsın	4	3,9 %
<i>vat</i>	Toxin	7	6,9 %

Die 102 untersuchten *E. coli* wiesen durchschnittlich $7,19 \pm 3,08$ VAGs auf (Spannweite: 3 bis 18). *OmpA* und *fimC* waren bei allen Isolaten vorhanden, während *afa/draB*, *gimB* und *neuC* bei keinem Stamm nachweisbar waren.

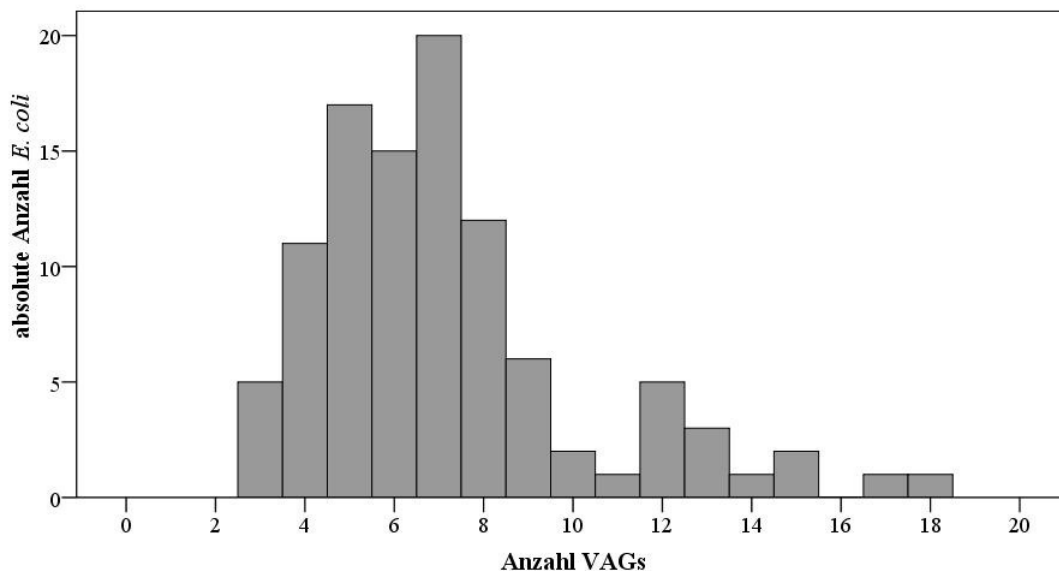


Abb. 14 Verteilung der virulenzassoziierten Gene (VAGs) innerhalb der 102 untersuchten, intestinalen *E. coli*

Aus Abb. 14 geht hervor, dass *E. coli* mit sieben VAGs am häufigsten vertreten waren (19,6 %), gefolgt von *E. coli* mit sechs bzw. fünf VAGs. 78,4 % aller untersuchten *E. coli*-Stämme wiesen maximal acht VAGs auf und nur 13,7 % verfügten über mehr als zehn VAGs.

Nach ECoR-Gruppen unterteilt besaßen *E. coli* der Gruppe A im Durchschnitt $6,16 \pm 1,66$ VAGs, *E. coli* der Gruppe B1 $5,26 \pm 1,67$ VAGs, *E. coli* der Gruppe B2 $11,04 \pm 3,46$ VAGs und *E. coli* der Gruppe D $7,12 \pm 1,03$ VAGs (Abb. 15).

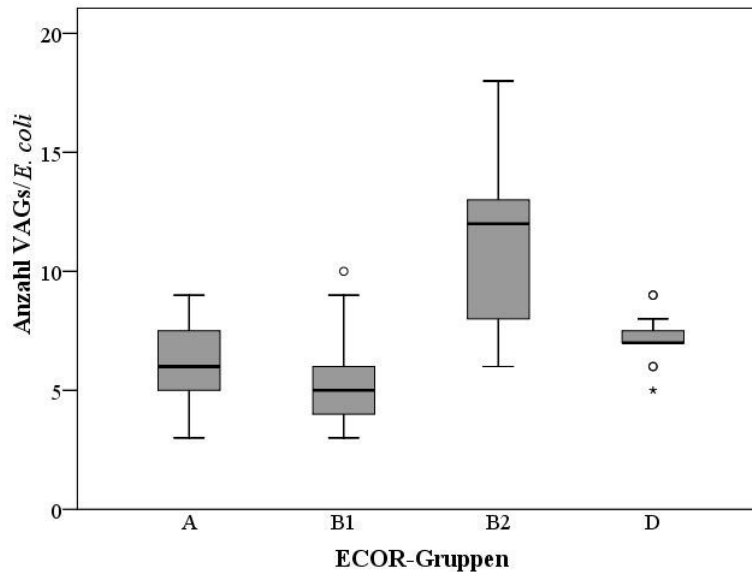


Abb. 15 Verteilung der virulenzassoziierten Gene (VAGs) von 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* innerhalb der ECoR-Gruppen

5.2.6.2.1 Adhäsingene

Von den neun untersuchten Adhäsingenen konnten bis auf *afa/draB* alle Adhäsingene in zumindest einem *E. coli*-Stamm nachgewiesen werden. *FimC* trat in allen *E. coli* auf, gefolgt von *crlA* in 90 Stämmen. Das genaue Vorkommen ist Tab. 16 zu entnehmen. Durchschnittlich kamen $2,72 \pm 0,92$ Adhäsingene/*E. coli* vor, mindestens jedoch ein und maximal fünf von neun Adhäsingenen.

Tab. 16 Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Adhäsingene

Adhäsingen	abs. Anzahl	rel. Anzahl
<i>afa/draB</i>	0	0,0 %
<i>papC</i>	1	1,0 %
<i>tsh</i>	4	3,9 %
<i>iha</i>	5	4,9 %
<i>sfa/foc</i>	5	4,9 %
<i>hra</i>	23	22,6 %
<i>mat</i>	47	46,1 %
<i>crlA</i>	90	88,2 %
<i>fimC</i>	102	100,0 %

Innerhalb der ECoR-Gruppen existierten in Bezug auf die Anzahl vorkommender Adhäsingene kaum Unterschiede. Die Mittelwerte der *E. coli* aller 4 ECoR-Gruppen lagen zwischen 2,61 bis 2,83 Adhäsingene/*E. coli*-Stamm (Abb. 16). *E. coli* der Gruppen A und B2 wiesen maximal fünf Adhäsingene auf.

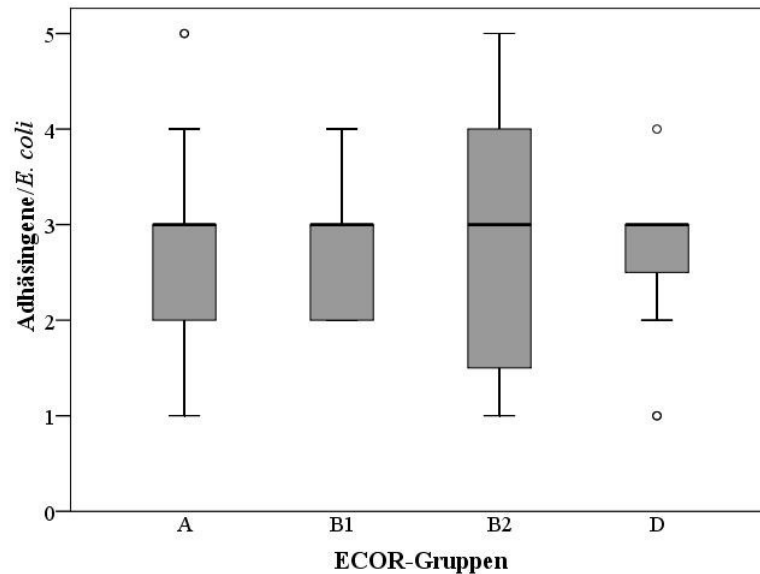


Abb. 16 Verteilung der für ExPEC-typischen Adhäsingene bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* innerhalb der ECoR Gruppen

5.2.6.2.2 Eisenakquirierungsgene

Es wurde das Vorhandensein von neun Genen, die für die Eisenaufnahme von Bedeutung sind, untersucht. Alle Gene konnten in unterschiedlichen Häufigkeiten nachgewiesen werden. Mehrfach traten *feoB* (48,0 %) und *chuA* (37,1 %) auf; demgegenüber waren *iucD* (1,0 %) und *ireA* (2,9 %) nur sporadisch vorzufinden (Tab. 17). Der Mittelwert lag bei $1,65 \pm 1,67$ Eisenakquirierungsgene/*E. coli*, wobei maximal sieben Eisenakquirierungsgene/*E. coli* vorkamen.

Tab. 17 Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Eisenakquirierungsgene

Eisenakquirierungsgen	abs. Anzahl	rel. Anzahl
<i>iucD</i>	1	1,0 %
<i>ireA</i>	3	2,9 %
<i>sitD ep.</i>	5	4,9 %
<i>sitD chr.</i>	11	10,8 %
<i>iroN</i>	12	11,8 %
<i>irp2</i>	20	19,6 %
<i>fyuA</i>	29	28,4 %
<i>chuA</i>	38	37,3 %
<i>feoB</i>	49	48,0 %

Wie Abb. 17 veranschaulicht, ergaben sich innerhalb der ECoR-Gruppen Unterschiede. In Gruppe A lag der Mittelwert bei $1,1 \pm 0,94$ Eisenakquirierungsgenen, in Gruppe B1 nur bei $0,42 \pm 0,77$ Eisenakquirierungsgenen. Mitglieder der Gruppe B2 wiesen durchschnittlich $3,71 \pm 1,81$ und diejenigen der Gruppe D $2,0 \pm 0,52$ Eisenakquirierungsgene auf.

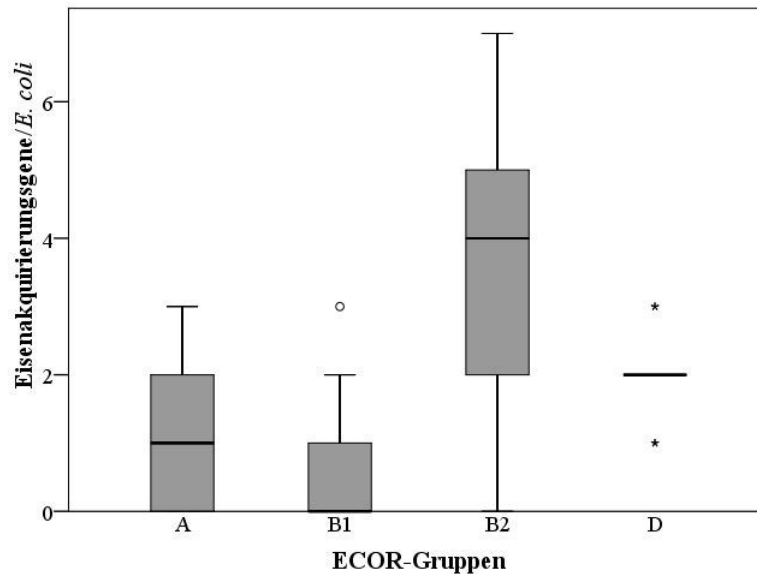


Abb. 17 Verteilung der für ExPEC-typischen Eisenakquirierungsgene bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* innerhalb der ECoR Gruppen

5.2.6.2.3 Gene für die Serumresistenz

In die Serumresistenz und die Zellprotektion sind sechs der untersuchten VAGs involviert. In absteigender Häufigkeit kamen *ompA*, *iss*, *cvi/cva*, *kpsMTII*, *traT* und *neuC* vor, hierbei war *ompA* in allen und *neuC* in keinem Isolat nachweisbar (Tab. 18).

Tab. 18 Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Serumresistenzgene

Serumresistenzgen	abs. Anzahl	rel. Anzahl
<i>neuC</i>	0	0,0 %
<i>iss</i>	3	2,9 %
<i>cvi/cva</i>	6	5,9 %
<i>kpsMTII</i>	24	23,5 %
<i>traT</i>	45	44,1 %
<i>ompA</i>	102	100,0 %

Das durchschnittliche Vorkommen lag bei $1,76 \pm 0,79$ Serumresistenzgenen/*E. coli* mit Schwankungen zwischen einem und vier Serumresistenzgenen. In Gruppe A und B1 kamen durchschnittlich $1,55 \pm 0,77$ bzw. $1,45 \pm 0,57$ Serumresistenzgene vor, wohingegen die Gruppen B2 und D mit $2,29 \pm 0,81$ und $2,0 \pm 0,73$ mehr Serumresistenzgene aufwiesen (Abb. 18).

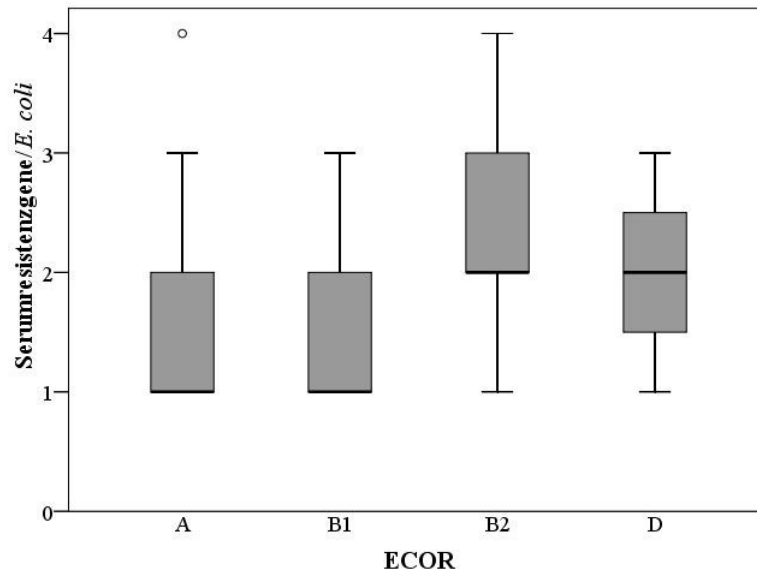


Abb. 18 Verteilung der für ExPEC-typischen Serumresistenzgene bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* innerhalb der ECoR Gruppen

5.2.6.2.4 Toxingene

Die fünf untersuchten Toxingene sind *hlyA*, *sat*, *vat*, *cnf1/2* und *astA*. Während *hlyA* und *sat* nur sporadisch vorkamen (je drei *E. coli*-Stämme) war *astA* mit 39,2 % in vergleichsweise vielen Isolaten vertreten. Der Mittelwert lag bei $0,64 \pm 0,67$ Toxingenen, wobei maximal drei der fünf Gene pro Stamm nachgewiesen wurden.

Tab. 19 Absolute und relative Häufigkeit der mittels PCR bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* nachgewiesenen, für ExPEC-typischen Toxingene

Toxingenen	abs. Anzahl	rel. Anzahl
<i>sat</i>	3	2,9 %
<i>hlyA</i>	3	2,9 %
<i>vat</i>	7	6,9 %
<i>cnf1/2</i>	12	11,8 %
<i>astA</i>	40	39,2 %

Pro ECoR-Gruppe kamen durchschnittlich 0,44 bis 0,75 Toxingene pro *E. coli* vor. Während Stämme der Gruppe D maximal ein Toxingen aufwiesen, waren bei *E. coli* der Gruppen A sowie B1 höchstens zwei und bei Stämmen der Gruppe B2 bis zu drei Toxingene nachweisbar.

5.2.6.2.5 Invasionsgene

Bei den drei hier untersuchten VAGs *gimB*, *ibeA* und *tia* handelt es sich um Invasionsgene. Alle 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* waren *gimB*-negativ. Der Nachweis von *tia* war bei

sechs (5,9 %) und der von *ibeA* bei 15 (14,7 %) *E. coli*-Stämmen erfolgreich. Durchschnittlich wies jeder *E. coli* $0,21 \pm 0,41$ Invasionsgene auf.

Von den 15 *ibeA*-positiven Isolaten stammten 13 (86,7 %) aus der Gruppe B2, die restlichen drei Stämme aus der Gruppe A. Die sechs *tia*-positiven *E. coli* rekrutierten sich zu gleichen Anteilen aus den Gruppen A und B1.

5.2.6.2.6 *pic* und *malX*

Das für eine Protease kodierende *pic* wurde in sieben (6,9 %) *E. coli*-Isolaten gefunden, die alle Vertreter der ECoR-Gruppe B2 waren. Ebenfalls zur Gruppe B2 gehörten alle 15 (14,7 %) *malX*-positiven *E. coli*-Stämme.

5.2.6.2.7 Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen einzelnen VAGs und ECoR-Gruppen

Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einiger VAGs waren hauptsächlich für die ECoR-Gruppe B2 feststellbar, traten aber auch bei den Gruppen B1 und D auf (Tab. 20).

Die VAGs *iha*, *sfa/foc*, *sitD chr.*, *ireA*, *sat*, *pic* und *malX* konnten nur bei *E. coli*-Stämmen der Gruppe B2 nachgewiesen werden. *KpsMTII* trat durchschnittlich häufiger in der Gruppe B2 und seltener in den Gruppen A und B1 auf. *FyuA* und *ibeA* kamen ebenfalls gehäuft in der Gruppe B2 und kaum in der Gruppe B1 vor. Auch *irp2* war zum größten Teil bei *E. coli* der Gruppe B2 und nur gelegentlich bis gar nicht in den anderen ECoR-Gruppen verbreitet. Ebenso kamen *cvi/cva* und *vat* signifikant häufiger in der Gruppe B2 vor.

Da *chuA* in der PCR nach Clermont et al. [44] zur Einteilung von *E. coli* in die Gruppencluster „A-B1“ und „B2-D“ dient, war es nur in Stämmen des letztgenannten Komplexes zu finden. Auch *crlA* kam sowohl in der Gruppe B2 als auch in der Gruppe B1 vermehrt vor, wohingegen *traT* und *feoB* verstärkt in *E. coli* der Gruppe D nachzuweisen waren. Letzteres trat außerdem signifikant seltener in Gruppe B1 auf.

Tab. 20 Übersicht über die bei 102 untersuchten, intestinalen *E. coli* nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene (VAGs), die mit den ECoR-Gruppen statistisch signifikant korreliert waren

VAG	zweiseitige Signifikanz (exakter Test nach Fischer)			
	ECoR A	ECoR B1	ECoR B2	ECoR D
<i>crlA</i>	0,100	0,016	0,000	1,000
<i>iha</i>	0,319	0,319	0,001	0,418
<i>sfa/foc</i>	0,319	0,319	0,000	0,592
<i>mat</i>	1,000	0,009	0,242	0,059
<i>chuA</i>	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>fyuA</i>	1,000	0,008	0,000	0,145
<i>ireA</i>	0,551	0,551	0,012	1,000
<i>irp2</i>	0,031	0,031	0,000	0,037
<i>sitD chr.</i>	0,032	0,032	0,000	0,205
<i>feoB</i>	0,396	0,001	0,641	0,028
<i>cvi/cva</i>	1,000	0,174	0,026	0,586
<i>kpsMTII</i>	0,010	0,041	0,000	1,000
<i>traT</i>	0,520	0,132	1,000	0,012
<i>sat</i>	0,551	0,551	0,012	1,000
<i>vat</i>	0,098	0,672	0,007	1,000
<i>ibeA</i>	0,142	0,005	0,000	0,119
<i>pic</i>	0,098	0,098	0,000	0,593
<i>malX</i>	0,005	0,005	0,000	0,119

Angegeben ist die zweiseitige Signifikanz des exakten Tests nach Fischer ($p = 0,05$).
 Graue Schrift: keine signifikanten Zusammenhänge;
 Schwarze Schrift: signifikante Zusammenhänge;
 Grau unterlegt: VAG trat signifikant häufiger in dieser ECoR-Gruppe auf.

5.2.7 Adhäsionsverhalten von *E. coli* aus dem Darm von Wild- und Hausschweinen

Im *in vitro*-Zellversuch wurde das Adhäsionsvermögen von jeweils 30 zufällig ausgewählten *E. coli* aus dem Darm von Wild- und Hausschweinen an IPEC-J2-Zellen getestet. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden die Kontrollstämme EcN und MG 1655 in die Versuche einbezogen. Beide Kontrollstämme waren bereits in Vorversuchen eingesetzt worden, wobei sich EcN als stärker adhärent an IPEC-J2-Zellen erwies als alle anderen bisher untersuchten *E. coli*-Isolate aus dem Darm gesunder Hausschweine. EcN zeigte in der vorliegenden Arbeit bei einer *Multiplicity of infection* (MOI) von 100 nach zweistündiger Inkubation eine durchschnittliche Adhäsion von 3,2 Bakterien/IPEC-J2-Zelle. Bei dem Kontrollstamm MG 1655 hafteten unter gleichen Versuchsbedingungen 0,25 Bakterien/IPEC-J2-Zelle. Die Adhäsionsraten der *E. coli* von Wildschweinen lagen im Durchschnitt bei $2,69 \pm 5,5$ Bakterien/Zelle. Demgegenüber hafteten bei *E. coli*-Stämmen von Hausschweinen durchschnittlich $0,49 \pm 5,5$ Bakterien/Zelle.

In Tab. 21 und den nachfolgenden Abbildungen sind die Adhäsionsraten der *E. coli* von Wild- und Hausschweinen gegenüber gestellt.

Tab. 21 Adhäsionsraten von 30 *E. coli* von Wildschweinen, die zufällig aus den insgesamt 102 zur Verfügung stehenden *E. coli* ausgewählt wurden und von 30 *E. coli* von Hausschweinen

Wildschwein- <i>E. coli</i>			Hausschwein- <i>E. coli</i>		
IMT-Nr.	N (abs.) ¹	Bakterien/Zelle ²	IMT-Nr.	N (abs.) ¹	Bakterien/Zelle ²
16419	$5,50 \cdot 10^4$	0,22	18156	$5,59 \cdot 10^4$	0,22
16420	$1,94 \cdot 10^5$	0,77	18157	$1,94 \cdot 10^4$	0,08
16421	$3,72 \cdot 10^6$	14,70	18158	$2,10 \cdot 10^6$	8,30
16423	$9,02 \cdot 10^5$	3,56	18159	$3,36 \cdot 10^4$	0,13
16424	$1,17 \cdot 10^6$	4,64	18160	$1,00 \cdot 10^2$	0,00
16426	$9,14 \cdot 10^4$	0,36	18161	$1,15 \cdot 10^4$	0,05
16414	$5,94 \cdot 10^5$	2,35	18162	$4,84 \cdot 10^2$	0,00
16429	$6,63 \cdot 10^6$	26,19	18163	$5,04 \cdot 10^4$	0,20
16430	$1,21 \cdot 10^5$	0,48	18164	$1,58 \cdot 10^4$	0,06
16432	$4,06 \cdot 10^4$	0,16	18165	$6,06 \cdot 10^4$	0,24
16433	$1,76 \cdot 10^5$	0,70	18166	$1,17 \cdot 10^3$	0,00
16434	$9,11 \cdot 10^4$	0,36	18167	$3,41 \cdot 10^4$	0,13
13122	$5,29 \cdot 10^4$	0,21	18168	$7,47 \cdot 10^4$	0,30
16436	$2,94 \cdot 10^4$	0,12	18169	$3,63 \cdot 10^3$	0,01
16437	$3,13 \cdot 10^3$	0,01	18170	$5,05 \cdot 10^4$	0,20
16440	$8,32 \cdot 10^3$	0,03	18171	$4,09 \cdot 10^3$	0,02
16441	$4,14 \cdot 10^6$	16,35	18172	$1,92 \cdot 10^2$	0,00
16442	$8,65 \cdot 10^4$	0,34	18173	$3,81 \cdot 10^4$	0,15
16443	$4,99 \cdot 10^4$	0,20	18174	$2,74 \cdot 10^2$	0,00
16415	$9,52 \cdot 10^4$	0,38	18175	$2,84 \cdot 10^4$	0,11
16445	$2,04 \cdot 10^6$	8,05	18176	$4,32 \cdot 10^4$	0,17
16451	$7,33 \cdot 10^4$	0,29	18177	$2,99 \cdot 10^4$	0,12
13100	$7,30 \cdot 10^4$	0,29	18178	$4,06 \cdot 10^5$	1,60
16454	$6,09 \cdot 10^4$	0,24	18179	$3,30 \cdot 10^4$	0,13
16455	$6,38 \cdot 10^4$	0,25	18180	$1,26 \cdot 10^5$	0,50
16456	$9,59 \cdot 10^4$	0,38	18181	$3,78 \cdot 10^3$	0,01
16457	$3,31 \cdot 10^3$	0,01	18182	$4,84 \cdot 10^3$	0,02
16458	$1,68 \cdot 10^5$	0,67	18183	$4,08 \cdot 10^5$	1,61
13109	$1,17 \cdot 10^5$	0,46	18184	$4,85 \cdot 10^4$	0,19
16416	$7,69 \cdot 10^4$	0,30	18185	$2,85 \cdot 10^4$	0,11

1 = absolute Anzahl adhärenter *E. coli* pro Well

2 = Verhältnis adhärenter *E. coli* zu IPEC-J2-Zellen

Die Anzahl adhärenter *E. coli* wurde aufgrund der übersichtlicheren graphischen Darstellung logarithmiert. Der logarithmierte Mittelwert adhärenter *E. coli* lag bei Isolaten aus Wildschweinen bei $5,06 \pm 0,75$, wohingegen bei *E. coli*-Stämmen aus Hausschweinen mit $4,23 \pm 0,98$ eine niedrigere Adhäsionsrate auftrat.

E. coli-Isolate aus dem Darm von Hausschweinen zeigten darüber hinaus größere Schwankungen in den Adhäsionsraten als solche von Wildschweinen. Der *E. coli*-Stamm IMT 18160 wies mit $1,00 \cdot 10^2$ adhärenten Bakterien/Well die geringste, der Stamm IMT 18158 mit $2,16 \cdot 10^6$ Bakterien/Well die höchste Adhäsionsrate unter den Hausschwein-*E. coli* auf. Die Adhäsionsraten der Wildschwein-*E. coli* lagen hingegen zwischen $3,13 \cdot 10^3$ und $6,63 \cdot 10^6$ Bakterien/Zelle.

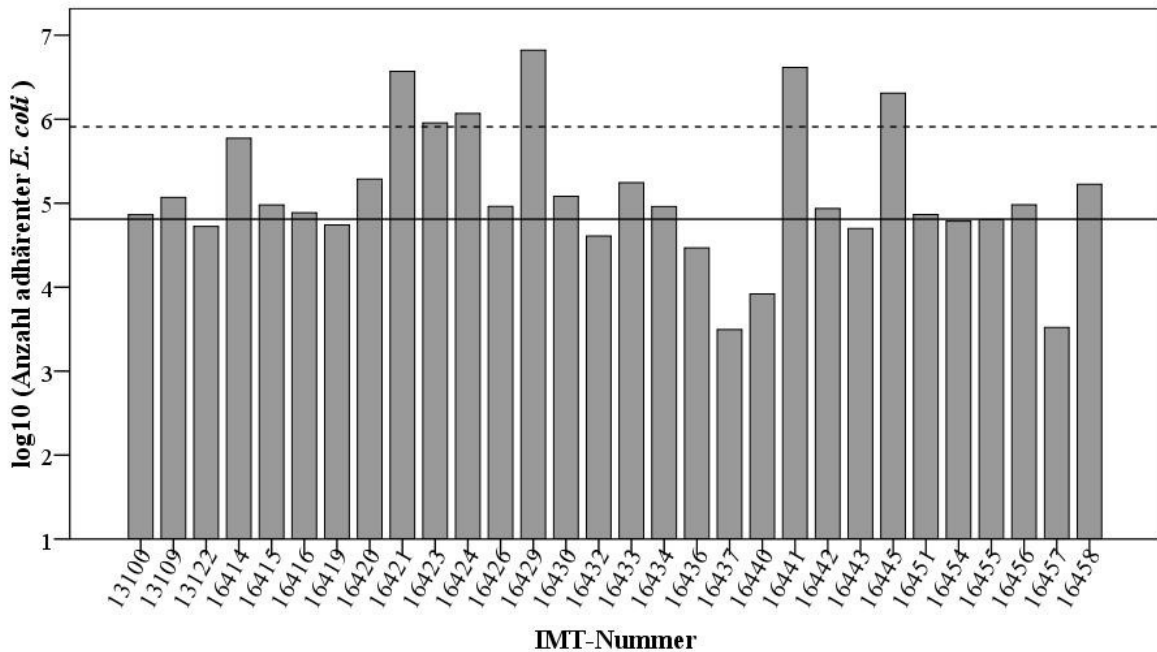


Abb. 19 Darstellung der Adhäsionsraten von 30 zufällig aus den 102 zur Verfügung stehenden Wildschwein-*E. coli* ausgewählten Stämmen an IPEC-J2-Zellen
 Gestrichelte Linie: logarithmierter Mittelwert der Adhäsionsrate des Kontrollstamms *E. coli* Nissle 1917 an IPEC-J2-Zellen
 Durchgezogene Linie: logarithmierter Mittelwert der Adhäsion des Kontrollstamms MG 1655 an IPEC-J2-Zellen

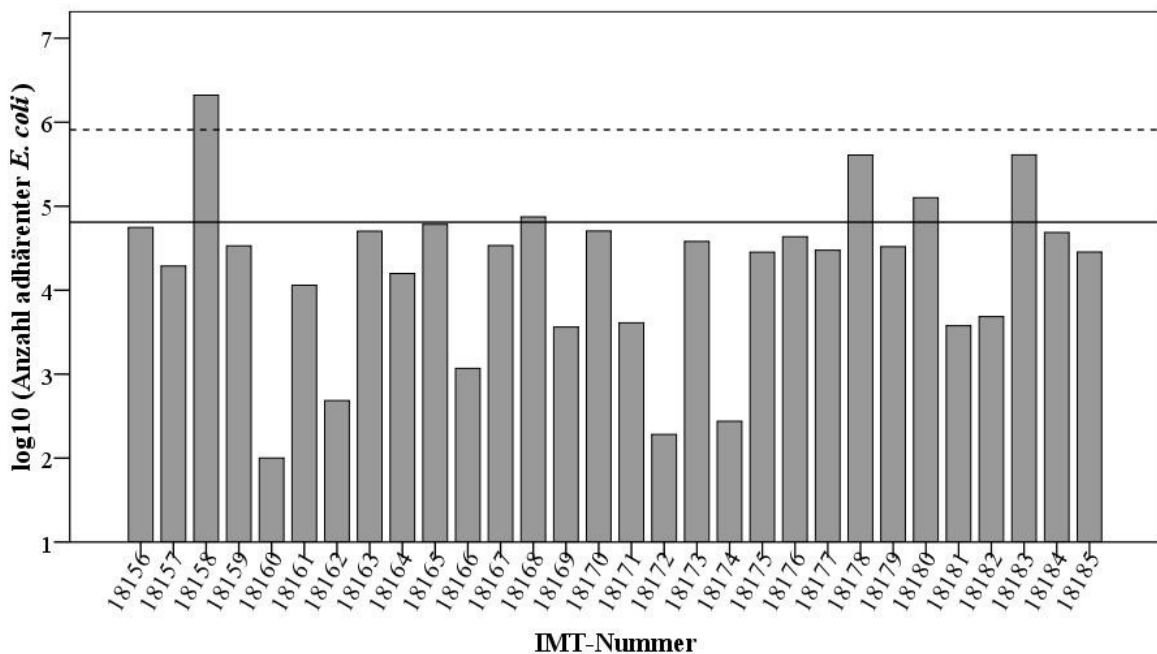


Abb. 20 Darstellung der Adhäsionsraten von 30 Hausschwein-*E. coli* an IPEC-J2-Zellen
 Gestrichelte Linie: logarithmierter Mittelwert der Adhäsionsrate des Kontrollstamms *E. coli* Nissle 1917 an IPEC-J2-Zellen
 Durchgezogene Linie: logarithmierter Mittelwert der Adhäsion des Kontrollstamms MG 1655 an IPEC-J2-Zellen

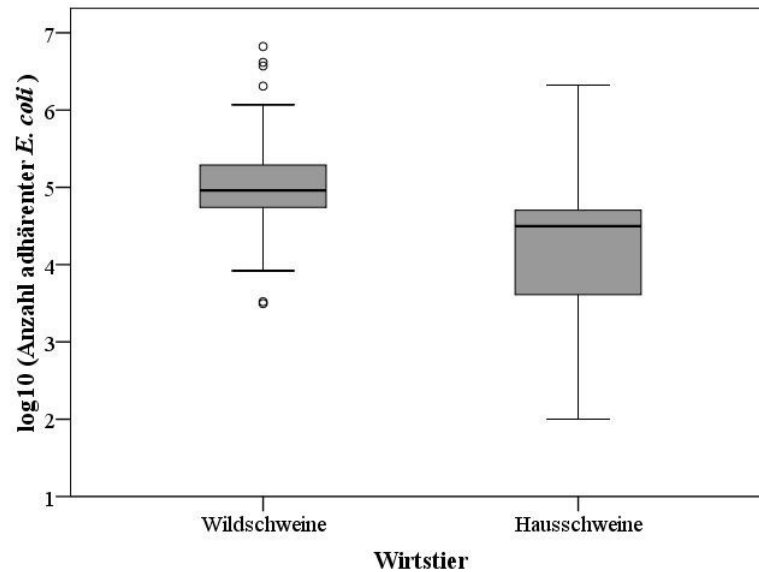


Abb. 21 Adhäsionsraten der 30 zufällig ausgewählten *E. coli* von Wildschweinen und der 30 *E. coli* von Hausschweinen an IPEC-J2-Zellen

Zur besseren Übersicht wurden die untersuchten *E. coli*-Stämme auf Basis der Vergleichsstämme EcN und MG 1655 in drei Gruppen gegliedert. Die Gruppe I beinhaltet *E. coli*, die unterhalb der Adhäsionsrate von MG 1655 liegen, Gruppe III alle *E. coli*, die sich oberhalb der Adhäsionsrate von EcN befinden. Die restlichen *E. coli* wurden der Gruppe II zugeordnet.

Tab. 22 Durchschnittliche Adhäsionsraten an IPEC-J2-Zellen von *E. coli* der Gruppen I bis III

Gruppe	<i>E. coli</i> vom Wildschwein		<i>E. coli</i> vom Hausschwein	
	Anzahl <i>E. coli</i>	durchschnittl. Adhäsionsrate (Bakterien/Zelle)	Anzahl <i>E. coli</i>	durchschnittl. Adhäsionsrate (Bakterien/Zelle)
I	9	0,15 ± 0,09	25	0,09 ± 0,08
II	15	0,57 ± 0,50	4	1,00 ± 0,61
III	6	12,25 ± 7,83	1	8,30

I: *E. coli*, deren Adhäsionsraten unterhalb der des Kontrollstamms MG 1655 lagen

II: *E. coli*, deren Adhäsionsraten zwischen der der Kontrollstämme MG 1655 und EcN lagen

III: *E. coli*, deren Adhäsionsraten oberhalb der des Kontrollstamms EcN lagen

Tab. 22 veranschaulicht, dass 50,0 % der untersuchten *E. coli* von Wildschweinen besser als der Stamm MG 1655, aber schlechter als der probiotische Stamm EcN adhärten. Ein Fünftel der Wildschwein-*E. coli* wies höhere Adhäsionsraten als der Kontrollstamm EcN auf. 83,3 % der *E. coli*-Stämme von Hausschweinen adhärten hingegen schlechter als der Stamm MG 1655 und nur ein *E. coli* vom Hausschwein besser als der EcN an IPEC-J2-Zellen.

Eine statistisch belegte Korrelation zwischen dem Adhäsionsvermögen und den bisher untersuchten genotypischen und phänotypischen Merkmalen der 102 untersuchten *E. coli*-Isolate konnte mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (*Spearman's Rho*) nur für das Gen *chuA* mit einer 2-seitigen Signifikanz von 0,000 sowie zwischen den ECoR-Gruppen mit einer 2-seitigen Signifikanz von 0,001 nachgewiesen werden. Der logarithmierte Mittelwert der Adhäsionsrate an IPEC-J2-Zellen lag bei Vertretern der ECoR-Gruppen A und B1 bei $4,74 \pm 0,48$ bzw. $4,56 \pm 0,50$. *E. coli*-Isolate der ECoR-Gruppen B2 und D wiesen mit von $5,43 \pm 0,5$ bzw. $6,12 \pm 0,63$ durchschnittlich höhere Adhäsionsraten auf.

5.2.8 Kohlenhydratverwertung von *E. coli* aus dem Darm von Wild- und Hausschweinen

Mit dem api 50 CH – System wurden 35 *E. coli* von Wildschweinen und 30 *E. coli* von Hausschweinen hinsichtlich der Verstoffwechslung diverser Kohlenhydrate untersucht. Das Ergebnis „positiv“ wurde als vollständige Verwertung des Substrats, das Ergebnis „negativ“ als nicht erfolgte Verwertung des Substrats und das Ergebnis „variabel“ als unvollständige Verwertung des Substrats und damit als nicht-positiv gewertet.

Grundsätzlich war die Kohlenhydratverwertung für jeden der untersuchten *E. coli* einzigartig. Es gab keine zwei Klone, die ein identisches Verstoffwechslungsprofil aller 49 Kohlenhydrate besaßen. Die folgenden zwölf Kohlenhydrate konnten von allen *E. coli* unabhängig vom Wirtstier vollständig verwertet werden: Glycerol, L-Arabinose, D-Ribose, D-Xylose, D-Galaktose, D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannose, D-Mannitol, D-Maltose, D-Trehalose und Kaliumglukonat. Die Verstoffwechslung der Substrate Erythritol, L-Xylose, Methyl- β D-Xylopyranosid, Inulin, L-Arabitol und Kalium-2-Ketoglukonat wurde nie als positiv eingestuft, als variabel und negativ hingegen schon. Bei den anderen Kohlenhydraten waren alle drei möglichen Ergebnisse vertreten.

Vergleich zwischen Wild- und Hausschwein-*E. coli*

Wildschwein-*E. coli* verstoffwechselten durchschnittlich 23,7 Kohlenhydrate (Spannweite: 18-28) vollständig. Bei Hausschwein-*E. coli* lag die vollständige Verwertungsrate im Mittel bei 22,4 Kohlenhydraten (Spannweite 18-27). Statistisch signifikante Unterschiede beider *E. coli*-Populationen traten in der Verstoffwechslung der folgenden acht Kohlenhydrate auf: die Hexosen L-Sorbose, D-Tagatose und L-Rhamnose, die Zuckeralkohole Dulcitol und Inositol, das Disaccharid D-Saccharose, das Trisaccharid D-Raffinose sowie bei Methyl- β D-Xylopyranosid (Tab. 23).

Tab. 23 Übersicht über die im api 50 CH – System unterschiedlich verwerteten Kohlenhydrate bei 35 zufällig ausgewählten *E. coli*-Stämmen von Wildschweinen und 30 *E. coli*-Stämmen von Hausschweinen (p = 0,05)

Kreuztabelle zur Kohlenhydratverwertung					
Substrat	P-Wert		Wirtstier		insgesamt
			Hausschwein	Wildschwein	
L-Sorbose	0,027	negativ	19	11	30
		positiv	7	18	25
		variabel	4	6	10
L-Rhamnose	0,040	negativ	3	0	3
		positiv	26	35	61
		variabel	1	0	1
Dulcitol	0,000	negativ	12	1	13
		positiv	17	32	49
		variabel	1	2	3
Inositol	0,000	negativ	29	22	51
		positiv	1	2	3
		variabel	0	11	11
D-Saccharose	0,010	negativ	9	2	11
		positiv	15	29	44
		variabel	6	4	10
D-Raffinose	0,016	negativ	10	2	12
		positiv	18	29	47
		variabel	2	4	6
D-Tagatose	0,000	negativ	15	17	32
		positiv	0	13	13
		variabel	15	5	20
Methyl-βD-Xylopyranosid	0,027	negativ	30	29	59
		positiv	0	0	0
		variabel	0	6	6

Die Verstoffwechslung der Ketohexose L-Sorbose wurde bspw. bei 24 (68,57 %) Wildschwein-*E. coli* als positiv oder variabel bewertet, bei Hausschwein-*E. coli* hingegen nur bei 11 (36,3 %) Isolaten. Die D-Tagatoseverwertung erbrachte bei 13 (37,1 %) *E. coli*-Stämmen von Wildschweinen ein positives Resultat, bei *E. coli*-Isolaten von Hausschweinen nur variable oder negative Ergebnisse. L-Rhamnose konnte von allen Wildschwein-*E. coli* vollständig abgebaut werden, wohingegen zumindest drei (10,0 %) Hausschwein-*E. coli* den Einfachzucker nicht verstoffwechseln konnten. Den Zuckeralkohol Dulcitol verwerteten 32 (91,4 %) *E. coli* von Wildschweinen gegenüber 17 (56,7 %) *E. coli* von Hausschweinen vollständig. Während die Inositolverwertung bei fast allen Hausschwein-*E. coli* (96,7 %) negativ ausfiel, war sie bei 37,1 % der Wildschwein-*E. coli*

positiv bis variabel. Ein ähnliches Bild ergaben die Daten von D-Saccharose und D-Raffinose. Beide konnten von 33 (94,3 %) Wildschwein-*E. coli* vollständig oder teilweise verstoffwechselt werden, aber nur von 70,0 % bzw. 66,7 % der Hausschwein-*E. coli*. Die Methyl- β D-Xylopyranosid-Verwertung erbrachte bei keinem der untersuchten *E. coli* positive Ergebnisse. Bei sechs (17,1 %) *E. coli* von Wildschweinen war die Verstoffwechslung mit variabel zu bewerten, bei Hausschwein-*E. coli* jedoch stets negativ. Beispielhaft sind die Ergebnisse der Dulcitol- und D-Tagatoseverwertung dargestellt (Abb. 22 und Abb. 23).

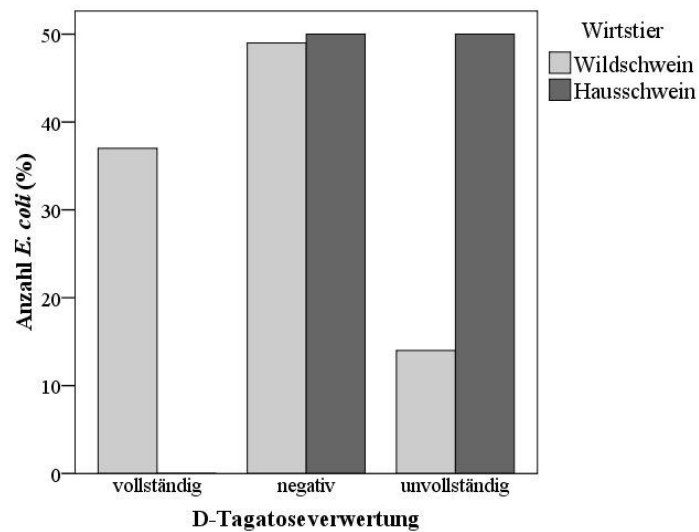


Abb. 22 D-Tagatoseverwertung im api 50 CH – System bei 35 zufällig ausgewählten *E. coli* von Wildschweinen und 30 *E. coli* von Hausschweinen

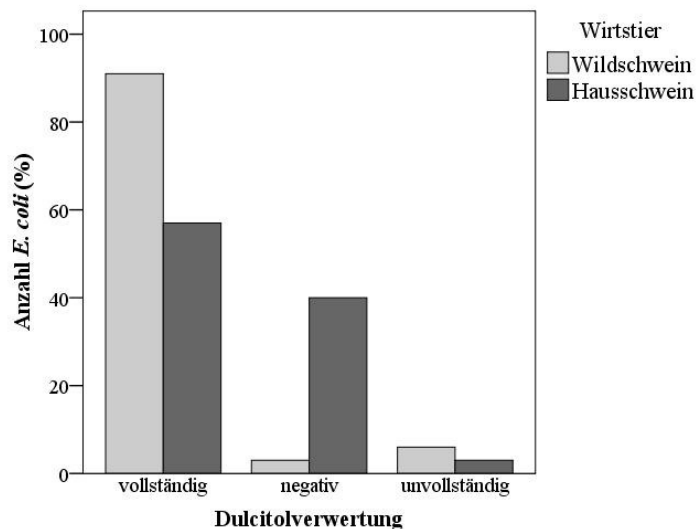


Abb. 23 Dulcitolverwertung im api 50 CH – System bei 35 zufällig ausgewählten *E. coli* von Wildschweinen und 30 *E. coli* von Hausschweinen

6. Diskussion

Wildschweine waren für die frühgeschichtlichen Jäger und Sammler Eurasiens wichtige Beutetiere. Mit Beginn der Domestizierung verschiedener Säugetierspezies im frühen Holozän setzte einer der wichtigsten sozialökonomischen Übergänge der menschlichen Geschichte ein. Im Nahen Osten wurden die ersten Domestizierungen von Schweinen auf 7000 v. Chr. datiert [30, 115].

Auch heutzutage sind Wildschweine in Eurasien und im Nordwesten von Afrika weit verbreitet. Es existieren etwa sechzehn verschiedene Subspezies [172]. Guiffra et al. haben anhand mitochondrialer Sequenzen des Cytochrom B-Gens eine asiatische und zwei europäische *Sus scrofa* – Gruppen klassifiziert [72]. Eine der europäischen Gruppen umfasst jedoch nur wenige Wildschweine in Süditalien. Die Mehrheit der europäischen Wildschweine sowie israelische Wildschweine gehören zu der anderen europäischen *Sus scrofa* – Gruppe (*Sus scrofa scrofa*). Zur asiatischen *Sus scrofa* – Gruppe zählen hauptsächlich japanische Wildschweine sowie domestizierte chinesische Mei Shan-Hausschweine und einige durch Rückkreuzungen mit asiatischen Schweinen entstandene asiatische Halotypen in europäischen Schweinerassen.

Die heutigen europäischen Schweinerassen stammen von domestizierten europäischen Wildschweinen ab und weisen keinerlei direkte Verwandtschaft zu Wildschweinlinien aus Nahost, der Türkei, Armenien oder aus dem Iran auf. Daher kann ein Vergleich der Daten der kommensalen coliformen Darmflora von europäischen Wildschweinen mit denen von Hausschweinen – als den direkten Nachfahren – Aufschlüsse über die Anpassung der intestinalen coliformen Mikroflora an das intestinale Milieu von Wild- und Hausschweinen liefern. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten über die kommensalen *E. coli* aus dem Darm gesunder Wildschweine umfassen Angaben zur Diversität, also der Vielfalt verschiedener *E. coli*-Klone im Darm, zum Auftreten von Virulenz- und virulenzassoziierten Genen, zur phylogenetischen Zuordnung sowie Erkenntnisse über das Adhäsionsvermögen und die Kohlenhydratverwertung der coliformen Darmflora. Sie bildet damit einen Ausgangspunkt für den Vergleich der coliformen Darmflora von *Sus scrofa scrofa* und *Sus scrofa domestica*.

Der porzine GIT ist eine Quelle verschiedener *Enterobacteriaceae*, die mehr als 90 verschiedene Spezies in 20 Genera umfassen. Dieser Arbeit vorausgehende Untersuchungen

zeigten, dass *E. coli* im Darm von Schweinen fast immer präsent sind und in der Regel die *Enterobacteriaceae*-Mikroflora dominieren [185]. Allerdings können auch andere *Enterobacteriaceae* wie *Enterococcus cloacae*, *Klebsiella pleuropneumoniae* und *Citrobacter freundii* den porzinen Darmtrakt dominieren [185].

In 642 australischen Säugern trat *E. coli* unter 24 untersuchten Darmbakterien am häufigsten auf und stellte mehrheitlich das dominierende Bakterium dar [74]. Das ubiquitäre und zahlreiche Vorkommen von *E. coli* im Darmtrakt von Vögeln und Säugern, die einfache Isolierung und die verhältnismäßig anspruchslose Kultivierung (fakultativ anaerob, pH 7-8, Temperaturoptimum bei 37°C) sowie die Existenz vielfältiger Daten insbesondere bezüglich pathogener *E. coli*-Stämme und die damit einhergehende Charakterisierung des Genoms prädestinieren *E. coli* für die vorliegenden Untersuchungen.

6.1 Untersuchungen zur Diversität

Aus dem Darm von 21 Wildschweinen wurden jeweils 30 *E. coli*-Isolate gewonnen. Jeweils zehn Isolate stammten aus dem Jejunum, dem Ileum sowie dem Kolon. Nach Lidin-Janson et al. sind bereits fünf Isolate ausreichend, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,3 % einen dominanten Klon, d.h. einen Klon, der mehr als 50,0 % der typisierten Isolate repräsentiert, nachzuweisen [125]. Bei einer Verringerung der Anzahl auf drei Isolate ist ein dominanter Klon noch mit 97-prozentiger Sicherheit vertreten. Da jedoch das vielfältige Vorkommen von *E. coli* untersucht werden sollte, mussten auch seltener auftretende Klone erfasst werden. Laut Schlager et al. sind 28 Isolate notwendig, um mit 90-prozentiger Wahrscheinlichkeit Klone einzuschließen, die weniger als 10 % der *E. coli*-Stämme im Darm repräsentieren, also so genannte *minor*-Klone darstellen [187].

Die insgesamt 624 für die Diversitätsuntersuchungen zur Verfügung stehenden Isolate setzten sich aus 105 verschiedenen *E. coli*-Klonen zusammen. Das durchschnittliche Vorkommen von 5,14 Klonen pro Tier weist auf eine gleichzeitige Besiedlung des Wirtstierdarms mit mehreren verschiedenen *E. coli*-Klonen hin. Jedoch lassen die relativ hohen Schwankungen von nur einem isolierten Klon in zwei Wildschweinen bis hin zu 16 Klonen in einem der Tiere eine individuelle und hoch diverse Besiedlung des Darmtrakts vermuten, wie sie auch schon für das Hausschwein beschrieben wurde [109, 185]. Gordon et al. berichteten über eine höhere Diversität bei adulten als bei juvenilen Mäusen [75] und auch Katouli et al. wiesen bei klinisch unauffälligen Ferkeln eine hohe Diversität von *E. coli* nach, die mit zunehmendem Alter vermutlich in Zusammenhang mit der veränderten Darmphysiologie infolge der

Aufnahme fester Nahrung weiter anstieg [109]. Überwiegend handelte es sich jedoch um transiente Stämme, die später nicht mehr auffindbar waren. Die wenigen, auch später noch nachweisbaren, residenten Stämme traten mehrheitlich erstmals kurz nach der Geburt auf – eine Tatsache, die auf *E. coli* als Erstbesiedler unberührter Nischen hinweist und eventuell auf dem Vorhandensein spezifischer Kolonisationsfaktoren beruht. Nach Berechnung der Diversitätsindizes der erhobenen Daten ergab sich eine höhere Diversität von *E. coli* im Kolon als im Jejunum oder Ileum, wie sie auch für *E. coli* bei Hausschweinen beschrieben wurde [185]. Mögliche Ursachen könnten zum einen das zahlenmäßig höhere Vorkommen von *E. coli* im Kolon als im Dünndarm sein, zum anderen die durch die geringere Passagerate und das reduzierte Redoxpotential bedingten günstigeren Kolonisationsbedingungen für eine Vielzahl von Klonen im Dickdarm. Außerdem weist gerade der Dickdarm, abgesehen von residenten Darmbakterien, eine Vielzahl transienter Stämme auf, die aus den oberen Darmregionen stammen. Auffallend war weiterhin, dass bei zwei Wildschweinen ein einzelner Klon alle 30 Isolate repräsentierte. Dies ist bisher für klinisch unauffällige Hausschweine nicht beschrieben worden [185]. Klar dominante *E. coli*-Stämme und die damit einhergehende geringere Diversität wurden bei Hausschweinen nur im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen nachgewiesen [109].

Verglichen mit Daten von Hausschweinen ist die Diversität von *E. coli* im Kolon von Wildschweinen niedriger [185]. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten stehen jedoch im Gegensatz zu Untersuchungen von Escobar-Páramo et al. [62]. Die dort aus frisch abgesetztem Kot isolierten *E. coli* stammten von Wirbeltieren aus verschiedenen Regionen weltweit. Die Diversität der gewonnenen *E. coli*-Isolate lag bei Wildtieren deutlich höher als bei Nutztieren, im Besonderen im Vergleich zwischen Wild- und domestizierten Hausschweinen. Ähnliches berichteten Hartel et al. von wild lebenden Hirschen und Gatterhirschen bezüglich der *E. coli*-Ribotypen [84]. Die in diesen Untersuchungen beschriebene höhere Diversität bei Wildtieren kann auf dem ständigen Kontakt der frei lebenden Tiere mit einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stoffen beruhen, die eine Quelle verschiedenster *E. coli* darstellen können. Gleichzeitig könnten jedoch über diese vielfältigen Quellen auch potentielle Konkurrenten von *E. coli* aufgenommen werden, die die Kolonisationsrate und damit die Diversität von *E. coli* verringern würden. Außerdem leben Wildschweine in Kleingruppen zusammen bzw. sind als ausgewachsene Keiler ausgeprägte Einzelgänger, die den direkten Kontakt zu Artgenossen nur während der Paarungszeit suchen. Zusätzlich steht ihnen in den Wäldern ein wesentlich größerer Lebensraum als den domestizierten Hausschweinen zur Verfügung. Der gegenseitige Kontakt der Tiere

untereinander sowie zu ihrem Kot als potentielle *E. coli*-Infektionsquelle ist weitaus geringer als bei Hausschweinen, ein wechselseitiger *E. coli*-Austausch erscheint also weniger wahrscheinlich, was auf eine geringere Diversität intestinaler *E. coli* bei Wildtieren deuten würde.

Hausschweine hingegen werden im Rahmen der konventionellen Tierproduktion in hoher Tierdichte auf engstem Raum gehalten. Der ständige Kontakt zu anderen Hausschweinen der Gruppe und dem abgesetzten Kot als mögliche *E. coli*-Infektionsquellen könnten zu einer höheren Austauschrate intestinaler *E. coli* innerhalb der Hausschweinpopulation führen und damit zu einer höheren Diversität der isolierten *E. coli*. Auf der anderen Seite könnten die strengen Zuchtanforderungen sowie die konstante Fütterungs- und Arzneimittelgabe im Rahmen der konventionellen Tierproduktion zu einem Abfall der intraluminalen Darmheterogenität geführt haben, die gemäß der Nischen-Variationsbreite-Theorie [210], der zufolge eine größere Breite an ökologischen Nischen zu einer Erhöhung der intraspezifischen Diversität führt, zu einer verminderten intestinalen Diversität beigetragen hat. Außerdem könnte der *E. coli*-Austausch mit der Umwelt, bedingt durch die äußerst abgeschirmte Haltung, eine eventuelle Reduzierung der Diversität intestinaler *E. coli* bei Hausschweinen zur Folge haben.

Die Diversitätsuntersuchungen von Escobar-Páramo et. al. beruhten auf einer anderen Methodik als die für diese Arbeit eingesetzte Makrorestriktion mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese. Escobar-Páramo et. al. nutzten die von Clermont et al. etablierte Multiplex-PCR zum Nachweis der Gene *chuA*, *yjaA* und des DNA-Fragments *TspE4.C2*. Die sich daraus ergebenden sieben unterschiedlichen Kombinationen (A₀: *chuA*⁻, *yjaA*⁻, *Tspe4.C2*⁻; A₁: *chuA*⁻, *yjaA*⁺ *Tspe4.C2*⁻; B₁: *chuA*⁻, *yjaA*⁻, *Tspe4.C2*⁺; B₂₂: *chuA*⁺, *yjaA*⁺, *Tspe4.C2*⁻; B₂₃: *chuA*⁺, *yjaA*⁺ *Tspe4.C2*⁺; D₁: *chuA*⁺, *yjaA*⁻, *Tspe4.C2*⁻ und D₂: *chuA*⁺, *yjaA*⁻, *Tspe4.C2*⁺) dienten zur Einteilung der gewonnenen *E. coli*-Isolate in sieben Gruppen.

Das für die vorliegende Arbeit genutzte Verfahren kann in Hinblick auf die Diversitätsbestimmungen insofern als das sensitivere Verfahren angesehen werden, da es die Unterscheidung einer Vielzahl verschiedener *E. coli*-Isolate erlaubt, wohingegen bei dem von Escobar-Páramo et al. angewendeten Verfahren lediglich eine Unterteilung der *E. coli*-Isolate in sieben Gruppen ermöglicht wird.

Außerdem wurden von Escobar-Páramo et al. pro Tier nur fünf *E. coli*-Isolate gewonnen, so dass zwar häufig vorkommende Klone relativ sicher, selten auftretende Klone aber nur vergleichsweise ungewiss gefunden werden konnten. Die für die vorliegende Arbeit erfassten Daten beruhen auf 30 isolierten *E. coli* pro Tier. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, seltener

auftretende Klone zu finden, deutlich erhöht. Aufgrund der unterschiedlichen methodischen Ansätze (Verfahren zur Diversitätsbestimmung, Anzahl der gewonnenen *E. coli*-Isolate) lassen sich beide Untersuchungen kaum vergleichen. Um die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Diversität zu verifizieren, sind daher weitere Untersuchungen mit einem ausgedehnten Stichprobenumfang notwendig, bei denen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese die Diversität intestinaler *E. coli* von Wild- und Hausschweinen verglichen werden kann.

6.1.1 Das Virulenzgenprofil im Zusammenhang mit der Besiedlung des Darms

53,7 % der isolierten Klone waren Träger von mindestens einem der folgenden Virulenzgene, also Genen, die eindeutig an der Pathogenese einer bakteriellen Erkrankung beteiligt sind: *est II*, *eltB*, *paa*, *aidA-I* und *astA*. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass genauso wie bei klinisch unauffälligen Hausschweinen auch in der gesunden Wildschweinpopulation *E. coli* mit Virulenzgenen gelegentlich vorkommen. Schierack et al. konnten sowohl im Darm von gesunden Sauen und Ferkeln als auch bei an Diarrhoe erkrankten Ferkeln *E. coli*-Stämme isolieren, die über ein ähnliches Virulenzgenprofil verfügten [184]. Ebenso wiesen Taras et al. bei gesunden Ferkeln *E. coli* mit Virulenzgenen nach [206]. Boerlin et al. berichteten von 34 % virulenzgetragenden kommensalen *E. coli* [28]. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass bei den hier untersuchten Wildschweinen die Anzahl der *E. coli*-Klone pro Tier höher liegt, sofern sie ein oder mehrere Virulenzgene besitzen. Möglicherweise tragen Virulenzgene zu einer erfolgreichen Kolonisation bei und konnten deshalb häufiger aus den betroffenen Tieren isoliert werden.

Ähnliches berichten Schierack et al. [186] von ExPEC-typischen, virulenzassoziierten Genen (VAGs), denen eine gewisse Beteiligung an der Pathogenese bakterieller Erkrankungen eingeräumt wird. Kommensale *E. coli*, die mehrere für ExPEC-typische VAGs – insbesondere Eisenakquirierungsgene – aufwiesen, konnten häufiger aus dem Darm isoliert werden als *E. coli* mit weniger VAGs. Wenngleich sich einige dieser *E. coli* mit mehreren VAGs als dominante *E. coli*-Klone erwiesen, konnten auch *E. coli* ohne dieses Genmuster die *E. coli*-Mikroflora dominieren. Die VAGs bzw. Eisenakquirierungsgene scheinen daher die Kolonisation zu unterstützen.

Das in der vorliegenden Arbeit am häufigsten nachgewiesene Virulenzgen ist *astA*, welches das erstmals für enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) beschriebene hitzestabile Enterotoxin 1 (*EAST1*) kodiert [179]. Außer in EAggEC, die bei Kindern eine persistierende Diarrhoe hervorrufen können, wurde *astA* bisher in humanen, bovinen und porzinen ETEC-Stämmen

nachgewiesen sowie in einigen EPEC-, DAEC- und EHEC-Stämmen und in kommensalen *E. coli* [28, 42, 157, 221, 222]. Das bisher publizierte Vorkommen liegt jedoch sowohl bei gesunden als auch bei an Diarrhoe erkrankten Hausschweinen unterhalb der hier ermittelten Häufigkeit von 48 % [12, 28, 41].

6.1.2 Der Zusammenhang zwischen der phylogenetischen Gruppe und der Kolonisation bestimmter ökologischer Nischen

Nach Dixit et al. besteht eine Korrelation zwischen bestimmten Darmregionen und den genetisch determinierten verschiedenen Gruppen der *Escherichia Coli Reference Collection* (ECoR). In deren Untersuchung wurden aus dem mittleren Ileum gesunder Schweine häufiger *E. coli* der ECoR-Gruppe A isoliert. Demgegenüber waren *E. coli* der ECoR-Gruppe B1 weit verbreitet im Fäzes, wohingegen generell keine *E. coli* der Gruppen B2 und D nachgewiesen wurden [50]. Diese Ergebnisse würden dafür sprechen, dass die verschiedenen Regionen des porcinen GIT infolge der sukzessiven Kolonisation kurz nach der Geburt nicht zufällig besiedelt werden, sondern bestimmte ökologische Nischen aufgrund unterschiedlicher geno- und phänotypischer Eigenschaften der *E. coli*-Stämme besetzt werden. Die Besiedlung spezifischer Habitate durch verschiedene Phylotypen, d.h. die ökologische Populationsstruktur von kommensalen *E. coli* wurde von Escobar-Páramo et al. untersucht [62]. Sie konnten belegen, dass die ECoR-Gruppen A und B1 häufiger bei *E. coli*-Stämmen aus domestizierten Schweinen auftraten und dass *E. coli*-Stämme der Gruppen B2 und D demzufolge häufiger in der Wildschweinpopulation verbreitet waren. Außerdem gehörten *E. coli* omnivorer und carnivorer Spezies häufiger als *E. coli* herbivorer Spezies der ECoR-Gruppe A und seltener der ECoR-Gruppe B2 an. In Bezug auf im Sekundärhabitat Wasser vorkommende *E. coli* ist nach Walk et al. die Gruppe B1 häufiger nachweisbar als die Gruppen B2 und D [213].

Bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten *E. coli* aus Wildschweinen konnten Vertreter aller vier ECoR-Gruppen A, B1, B2 und D in allen drei Darmabschnitten nachgewiesen werden. Am häufigsten traten im Gegensatz zu anderen Untersuchungen *E. coli* der Gruppe B2 auf, gefolgt von den Gruppen A, D und B1 [41, 50]. *E. coli* aller ECoR-Gruppen konnten den Darm dominieren und es war – wie bereits von Schierack et al. für *E. coli* von Hausschweinen beschrieben [185] – keine statistisch eindeutige Korrelation bestimmter ECoR-Gruppen zu den drei Darmregionen nachweisbar. Allerdings kamen *E. coli* der Gruppe A und B2 häufiger in Jejunum und Ileum als im Kolon vor. Im Unterschied dazu waren Vertreter der Gruppe B1, wie bereits von Dixit et al. beschrieben, vermehrt im Dickdarm

nachweisbar [50]. Unabhängig von der ECoR-Gruppe untersuchten Bettelheim et al. die Verteilung der Serotypen von *E. coli* bei an plötzlichem Kindstod verstorbenen Säuglingen im Ileum, Kolon und Rektum. Serogruppen aus dem Ileum konnten auch im Rektum nachgewiesen werden, so dass auch bezüglich der Verteilung der Serogruppen nicht von einer gezielten Kolonisation bestimmter Darmregionen durch *E. coli* ausgegangen werden kann [20]. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Frage, ob der Darm als Ganzes ausreichend voneinander abgegrenzte Habitate für die Ausbildung einer strengen phylogenetischen Populationsstruktur bietet oder ob nicht die hohe Austauschrate an genetischen Informationen durch horizontalen Gentransfer zwischen einzelnen *E. coli*-Stämme das Kolonisieren adaptiverer gegenüber phylogenetischen Klonen fördert.

6.2 Geno- und phänotypische Charakterisierung der 102

***E. coli*-Stämme von Wildschweinen**

6.2.1 Die Verteilung der phylogenetischen Gruppen

Die von Clermont et al. etablierte Triplex-PCR ermöglicht durch den Nachweis zweier Gene (*chuA* und *yjaA*) und des DNA-Fragments TSPE4.C2 die phylogenetische Einteilung der meisten *E. coli*-Stämme in die vier ECoR-Gruppen A, B1, B2 und D [44]. B2 soll die ursprüngliche *E. coli*-Linie darstellen, von der sich zunächst die Schwestergruppe D und später das A+B1-Cluster abgespalten haben. Das A+B1-Cluster teilte sich dann in die Schwestergruppen A und B1 auf [49, 79, 120, 208].

Untersuchungen von Dixit et al wiesen darauf hin, dass sich diese Gruppen in der Besiedlung ökologischer Nischen unterscheiden [50]. Auch die für die vorliegende Arbeit generierten Daten weisen auf eine ungleiche Verteilung der ECoR-Gruppen innerhalb der untersuchten *E. coli*-Population hin. Es trat kein gleichmäßiges Verteilungsmuster der *E. coli* auf alle ECoR-Gruppen auf; vielmehr beinhalteten die Gruppen A und B1 über 60 % der 102 untersuchten *E. coli* aus Wildschweinen, während die Gruppe D nur zu 15,7 % vertreten war. Im Gegensatz zu den generierten Daten aus den zuvor diskutierten Diversitätsuntersuchungen, bei denen Gruppe B2, gefolgt von Gruppe A am häufigsten und Gruppe B1 am seltensten auftrat, war die Gruppe B2 hier nur knapp einem Viertel, Gruppe B1 jedoch fast einem Drittel der 102 *E. coli* zuzuordnen. Dieser Umstand ließe sich einerseits mit der diskutierten gezielten Besiedlung bestimmter Darmregionen durch *E. coli*-Phylotypen erklären. So handelte es sich bei den 102 *E. coli* um Isolate aus dem Kolon bzw. dem Rektum von Wildschweinen, wohingegen die für die Diversitätsuntersuchungen verwendeten

E. coli-Isolate sowohl aus dem Dün- als auch aus dem Dickdarm stammten. Das gehäufte Auftreten von Gruppe B1 im Kolon wurde bereits für die Diversitätsuntersuchungen beschrieben und könnte das Verhältnis der ECoR-Gruppen zugunsten der Gruppe B1 unter den 102 *E. coli* erklären. Anzumerken ist außerdem, dass es zusätzlich zu den vier ursprünglich mittels PCR nach Clermont et al. nachweisbaren ECoR-Gruppen A, B1, B2 und D mindestens zwei weitere ECoR-Hybridgruppen – die Gruppen AxB1 und ABD – gibt. Diese wurden von Wirth et al. durch sequenzbasierte phylogentische Analysen bei einem Drittel von 460 untersuchten *E. coli*-Isolaten nachgewiesen und sind mithilfe der ECoR-PCR nicht detektierbar. Vertreter der ECoR-Hybridgruppe AxB1 stammen von den beiden ursprünglichen ECoR-Gruppen A und B1 ab, während die ECoR-Hybridgruppe ABD eine sehr heterogene Ansammlung von *E. coli*-Stämmen verschiedener Abstammungen beinhaltet [217]. Da diese beiden ECoR-Hybridgruppen jedoch nicht mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Methoden nachweisbar sind, können bezüglich ihrer Verteilung im GIT und ihres Anteils innerhalb der vier ursprünglichen ECoR-Gruppen keinerlei Aussagen getroffen werden.

6.2.1.1 Die phylogenetische Gruppe und das Virulenzgenprofil

Untersuchungen zeigen, dass die vier phylogenetischen Gruppen zum einen in einer Reihe phänotypischer Ausprägungen wie der Zuckerverwertung, dem Antibiotikaresistenzprofil und der temperaturabhängigen Wachstumsrate variieren können [76, 78]. Zum anderen sind viele Virulenz- und virulenzassoziierte Gene nicht zufällig auf die vier Gruppen verteilt. In den Stämmen der Gruppen B2 und D können deutlich häufiger als in den Gruppen A und B1 virulenzassoziierte Faktoren nachgewiesen werden [23, 102, 153]. Darmpathogene *E. coli* stammen meistens aus den Gruppen A und B1 [60], wohingegen der größte Teil der ExPEC-Stämme zur Gruppe B2, gefolgt von Gruppe D, gehört. Bereits häufig publiziert wurde die Tatsache, dass unter den kommensalen intestinalen *E. coli* oftmals Stämme der Gruppe B2 vertreten sind [60-62, 223]. Auch die vorliegenden Daten für diese Arbeit zeigen, dass 23,5 % der untersuchten intestinalen *E. coli* von klinisch unauffälligen Wildschweinen zur Gruppe B2 gehören. Im Gegensatz dazu fanden Dixit et al. bei gesunden Ferkeln nur *E. coli* der Gruppe A und B1 [50]. Ähnliches berichten Picard et al. über kommensale *E. coli* beim Menschen [162]. Andere Studien weisen jedoch mit wechselnden Häufigkeiten das Auftreten aller vier Phylotypen sowohl bei kommensalen als auch bei pathogenen *E. coli* von Menschen [55, 62, 196] und Tieren [12, 63, 76, 185] nach. Die Ursachen für diesen alternierenden Nachweis der verschiedenen ECoR-Gruppen können vielschichtig sein. So

wurden *E. coli* der EcoR-Gruppe A in der Fäzes von gesunden Menschen aus den Tropen doppelt so häufig nachgewiesen wie in der Fäzes von Menschen aus den gemäßigten Klimazonen [61]; und auch bei Säugetieren konnte gezeigt werden, dass Vertreter der ECoR-Gruppen A und B1 häufiger im Kot von Tieren aus tropischen Gebieten vorkommen [62]. Das Klima erscheint also durchaus als potentieller Einflussfaktor. Ebenso kann – unabhängig vom Klima – eine Beeinflussung durch sozialökonomische Faktoren nicht ausgeschlossen werden: die Bewohner der gemäßigten Zone stammten alle aus technologisch hoch entwickelten Ländern mit anderen Ernährungsweisen und hygienischen Standards als die Menschen der tropischen Zone [61]. Neben den klimatischen und ernährungsbedingten Faktoren scheint auch die Darmphysiologie an der unterschiedlichen Verteilung der ECoR-Gruppen beteiligt zu sein. Escobar et al. wiesen deutliche Unterschiede in der Verteilung intestinaler *E. coli* von Menschen, Vögeln und Säugetieren auf die vier ECoR-Gruppen nach [62]. Trotz wechselnden Häufigkeiten werden jedoch im überwiegenden Anteil der Studien alle vier EcoR-Gruppen unabhängig vom Wirt im Darm nachgewiesen, der damit ein Reservoir für *E. coli* aller ECoR-Gruppen darstellt, zumal diese einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung aufweisen (siehe 6.2.1).

6.2.1.2 Die phylogenetische Gruppe und die Kolonisation sowie die Persistenz im GIT

Die zuvor beschriebene Korrelation zwischen phylogenetischer Gruppe und dem Vorkommen von Virulenzfaktoren und virulenzassoziierten Genen konnte auch bei den 102 untersuchten *E. coli* festgestellt werden. Vertreter der Gruppe B2 besaßen mit durchschnittlich 11,04 VAGs deutlich mehr ExPEC-typische VAGs als Vertreter der Phylotypen D (7,12 VAGs), A (6,16 VAGs) und B1 (5,26 VAGs). Einerseits verursachen *E. coli* der Gruppe B2 extraintestinale Infektionen, andererseits können sie aber auch regelmäßig aus dem Darm asymptomatischer Träger isoliert werden. Gleichwohl können kommensale *E. coli* bei immungeschwächten Wirten zu Infektionen führen, wohingegen virulente Stämme auch im Darm von asymptomatischen Wirten gefunden werden können. Bei den in dieser Arbeit untersuchten VAGs handelt es sich größtenteils um Gene, die Proteine für die Adhäsion und die Eisenakquirierung kodieren und daher essentiell für Kolonisation, Wachstum und Vermehrung von Bakterien sind. Der Besitz und der Erwerb dieser Gene erweitern das Spektrum der für *E. coli* kolonisierbaren Nischen im GIT. Die damit erworbenen Eigenschaften könnten sich demnach zufällig entwickelt haben. So ermöglicht die Bildung verschiedener Toxine und Invasine einerseits eine bessere Chance im Konkurrenzkampf um knappe Ressourcen der Bakterien untereinander bzw. bei der Besiedlung bisher

unerreichbarer Nischen mittels Translokation durch die Darmwand – andererseits kann dies aber gleichzeitig zu extraintestinalen Infektionen führen. Le Gall et al. beschrieben eine große genetische und ökologische Heterogenität innerhalb der ECoR-Gruppe B2, wobei sich die Untergruppen im Sequenztyp, in der Virulenz und der Kombination der VAGs voneinander unterscheiden. Weiterhin besteht die basale Untergruppe aus hochvirulenten Stämmen [118]. Daher erscheint es auch möglich, dass sich hochvirulente ExPEC-Stämme nicht erst durch den Erwerb von zusätzlichen Genen aus den kommensalen B2-Phylotypen rekrutiert haben, sondern dass avirulente, kommensale Stämme durch den Verlust einiger VAGs aus virulenten ExPEC-Stämmen entstanden sind. Sicherlich kann ein erneuter Erwerb von VAGs bzw. ein ständiger Verlust und Wiedererwerb von VAGs nicht ausgeschlossen werden.

Zu klären bleibt, ob virulenzassoziierte Gene die Kolonisation des Darms maßgeblich beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit stellten B2-Phylotypen, die das größte Spektrum an VAGs besitzen, nur knapp ein Viertel der untersuchten *E. coli* dar. Häufiger waren *E. coli* der ECoR-Gruppen A und B1 mit durchschnittlich weniger VAGs vertreten. Allerdings stammen die hier untersuchten Stämme aus dem Darminhalt von Kolon und Rektum. Daher ist es schwierig zu sagen, ob durch die untersuchten *E. coli*-Stämme eine erfolgreiche Kolonisation oder aber eine bloße Passage durch den GIT erfolgte. In Bezug auf die Persistenz im Kolon wiesen Nowrouzian et al. zwar eine positive Korrelation zur Phylogruppe B2 nach, zeigten jedoch gleichzeitig, dass diese Persistenz mit dem Vorhandensein der Gene *papC* (P-Fimbrie) und *iutA* (Aerobactin) in Zusammenhang steht und nicht direkt mit der Zugehörigkeit zur Gruppe B2 [153].

6.2.1.3 Vergleich der phylogenetischen Verteilung bei *E. coli* von Wild- und Hausschweinen

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten zeigen, dass die Phylogruppen B2 und D deutlich häufiger bei *E. coli* aus Wildschweinen vorkommen als bei entsprechenden Untersuchungen von *E. coli* aus gesunden Hausschweinen [50, 185]. Von ähnlichen Ergebnissen berichten Escobar-Paramo et al. bei einem Vergleich der ECoR-Gruppen von Wildtieren und domestizierten Tieren, insbesondere aber auch direkt zwischen Wild- und Hausschweinen [62]. Durch den Domestizierungsprozess des Schweins hat der Mensch massiv in die Umwelt eingegriffen und durch die Zucht bestimmter Rassen, durch eine einheitliche Futtermittelgabe und durch den Einsatz von Antiinfektiva insbesondere die Heterogenität des Darmmilieus beeinflusst. Vor allem die Antiinfektivgabe könnte zu einer Reduzierung der Phylogruppe B2 bei *E. coli* aus domestizierten Schweinen geführt haben, da B2-Stämme weniger resistent

gegenüber Antiinfektiva sind [104, 160, 195]. So können in B2-Stämmen seltener Integrone nachgewiesen werden, die zum interbakteriellen Austausch von Resistenzgenkassetten beitragen [45]. Um das ungleiche Verteilungsmuster der Phylogruppen bei domestizierten Tieren und Wildtieren epidemiologisch zu untersuchen, sind weitere Studien notwendig. Dabei sollten *E. coli* beider Tiergruppen aus dem gleichen Darmabschnitt isoliert werden und dies möglichst in wöchentlichen Abständen über einen mehrmonatigen Zeitraum, um zwischen residenten und transienten Stämmen zu unterscheiden. Nowrouzian et al. definierten beispielsweise residente *E. coli*-Stämme als solche, die mehr als drei Wochen lang im Darm von Kindern nachweisbar waren [152]. Außerdem sollte der von Gordon und Cowling beschriebene Einfluss des Klimas und der Körpermasse in die Planung einbezogen werden [76].

6.2.2 Der Nachweis von Virulenzgenen und die damit verbundene Pathogenität

Der Besitz von Virulenzgenen in bestimmten Kombinationen scheint mit der klinischen Symptomatik und Pathogenese intestinal-pathogener *E. coli* assoziiert zu sein. Diese werden aufgrund ihres Virulenzgenprofils u. a. in ETEC, EPEC, EaggEC und STEC unterteilt. Bei Untersuchungen von *E. coli*-Isolaten aus dem Darm an Diarrhoe erkrankter Schweine (Neugeborendiarrhoe (ND), Diarrhoe nach dem Absetzen (*postweaning diarrhea*, PWD) oder Ödemkrankheit (*edema disease*, ED)) sind regelmäßig hohe Nachweisraten und diverse Kombinationen von Virulenzgenen beobachtbar [12, 41, 69, 140, 220]. Dazu gehören die Toxingene *stx2e*, *est Ia*, *est II* und *eltB* sowie die Fimbriengene *fedA* (F18), *faeG* (F4, K88), *fanA* (F5, K99), *fasA* (F6, P987), *fimF41a* (F41) und *fedA* (F18) [69]. Allerdings können auch kommensale *E. coli*-Isolate einzelne bzw. wenige Virulenzgene aufweisen. Dies wird sowohl durch die in dieser Arbeit generierten Daten als auch durch weitere Studien belegt [28, 156, 184]. Das für intestinale, schweinepathogene *E. coli* typische Shiga-Toxigen *stx2e* war bei drei (2,9 %) *E. coli*-Isolaten nachweisbar, in denen gleichzeitig *est Ia* vorkam, das ein hitzestabiles Toxin kodiert. Außerdem waren vier (3,9 %) *E. coli*-Isolate positiv für *est II* bzw. ein (1,0 %) *E. coli*-Isolat für *fedA*, das die F18-Fimbrie kodiert. Dieses sporadische Auftreten von Virulenzgenen bei kommensalen *E. coli* wurde von Boerlin et al. in ähnlicher Ausprägung bei kommensalen *E. coli* von Hausschweinen beschrieben [28]. Und auch bei Schierack et al. und Niewerth et al. lag bspw. das Vorkommen von *stx2e* bei 2,6 % bzw. 6,6 % [151, 184]. Schierack et al. berichten allerdings auch, dass 68,8 % der untersuchten kommensalen *E. coli* mindestens eines der zuvor genannten Virulenzgene aufwiesen,

wohingegen bei den hier untersuchten *E. coli* von Wildschweinen nur 7,8 % ein oder zwei dieser Virulenzgene besaßen [184]. Nachweisraten in der Höhe wie von Schierack et al. beschrieben, sind von anderen Autoren nur in Zusammenhang mit *E. coli* von an ED, PWD oder ND erkrankten Hausschweinen festgestellt worden [41, 150, 220]. Abgesehen von der Beteiligung der bakteriellen hitzelabilen und hitzestabilen Enterotoxine sowie der Shiga-Toxine an der Pathogenese verschiedener intestinaler Erkrankungen, wird zunehmend die Rolle von Enterotoxinen als Kolonisierungsfaktor diskutiert. Johnson et al. nutzten ein *in vitro*-Adhäsionsmodell mit enterotoxischen *Escherichia coli* (ETEC), um zu zeigen, dass das hitzelabile Toxin (LT) – zusätzlich zu seiner Beteiligung an der sekretorischen Diarrhoe – die Adhäsion von ETEC an intestinalen Epithelzellen unterstützt [100]. Allan et al. wiesen bei immunkompetenten Mäusen ebenfalls eine effizientere Kolonisation des Darms durch LT-positive *E. coli*-Isolate als durch eine entsprechende LT-negative Mutante nach [4].

Der bloße Nachweis eines bzw. einiger Virulenzgene ist jedoch nicht geeignet, *E. coli*-Isolate zu den pathogenen *E. coli*-Stämmen zu zählen. Vielmehr müsste dieser Stamm, ausgestattet mit einem bestimmten Virulenzgenprofil, eine Wirtsspezies infizieren und eine Erkrankung verursachen. So ist bei den intestinal-pathogenen ETEC die Virulenz mit Toxinen, aber auch mit fimbrialen Adhäsinen assoziiert, die durch Anheften an die Epithelzellen erst die Kolonisation des Darms ermöglichen [140]. Eine weitere mögliche Ursache für den Nachweis von virulenztragenden *E. coli* aus gesunden Tieren ist, dass der untersuchte *E. coli*-Stamm in zu geringer Anzahl, d.h. in zu geringer Infektionsdosis vorkommen könnte, oder aber nur transient ist, da mögliche Bindungsstellen bereits von der kommensalen Mikroflora besetzt sind. Natürlich können auch die Wirtstiere selbst unempfindlich, d. h. natürlich resistent oder zumindest hoch immun gegenüber virulenztragenden *E. coli* sein, so dass deren bloßes Vorkommen nicht zwangsläufig zu einer klinisch apparenten Erkrankung beim Wirtstier führen muss. Allerdings wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, porzinen *E. coli* auf Virulenzgene detektiert, die typisch für schweinepathogenen *E. coli* sind.

Desweiteren ist der genotypische Nachweis eines Virulenzfaktors nicht gleichbedeutend mit der Expression, d. h. dem Vorhandensein des Toxins bzw. Adhäsins [147, 165]. Um dies zu verifizieren, müssten Expressionsstudien (z. B. mit Hilfe von Microarrays) durchgeführt werden.

Nicht eindeutig lässt sich die Frage beantworten, ob es sich bei den hier isolierten *E. coli* um ehemals pathogene *E. coli* handelt, die Virulenzgene verloren haben, oder aber um kommensale *E. coli*, die diese erworben haben. Wie viele nicht-essentielle Gene liegen zahlreiche Virulenzgene auf mobilen genetischen Elementen. Die Gene für die hitzestabilen

und -labilen Toxine sowie für die F4-, F5-, F6- und F18-Fimbrien befinden sich auf Plasmiden und auch für *stx2e* wird eine Lokalisation im eventuell defekten Genom von Phage ϕ P27 beschrieben [146]. Diese zum flexiblen Genpool gehörenden Virulenzgene können mittels horizontalen Gentransfers, hauptsächlich durch Konjugation, weitergegeben werden. Andrup und Andersen berichten von 0,15 Transkonjuganten pro Donorzelle und Minute bei der F-Plasmid-gesteuerten Konjugation von *Escherichia coli in vitro* [5]. Insgesamt sind mindestens 17,0 % aller in *E. coli* vorhandenen Gene horizontal erworben worden [117]. Daher erscheint es durchaus möglich, dass kommensale, virulenzgetragene *E. coli* aus Wildschweinen – aber auch aus Hausschweinen – als Reservoir für den Erwerb von weiteren Virulenzfaktoren durch andere *E. coli*-Stämme dienen.

Zusätzlich zu den für schweinepathogene *E. coli* typischen Virulenzgenen ist im Rahmen dieser Arbeit das Vorkommen dreier weiterer potentieller, mit porziner Diarrhoe assoziierter Virulenzfaktoren untersucht worden: *paa*, *aidA-1* und *sepA*.

Paa kodiert ein Nicht-Fimbrien-Adhäsion, das an der initialen Adhärenz am Darmepithel beteiligt und in diversen Pathotypen u. a. in ETEC, EPEC und STEC verbreitet ist. Unter den kommensalen *E. coli* von Wildschweinen war *paa* in 25,5 % der Stämme nachweisbar. Boerlin et al. fanden in Kanada *paa* bei *E. coli* von klinisch unauffälligen Hausschweinen zu 1 %, bei ETEC hingegen zu 88,0 % [28]. Auch Zhang et al. konnten *paa* bei 43,8 % der *E. coli* von an Diarrhoe erkrankten Schweinen in den USA nachweisen [224]. Häufig tritt *paa* assoziiert mit *est Ia* und *sepA* auf, wobei alle drei zusammen auf dem Plasmid *pTENT2* liegen können [119], das gleichzeitig das Antibiotikaresistenzgen *tetA* beherbergen kann. Da *paa* jedoch bei einem Viertel der untersuchten *E. coli*-Isolate von gesunden Wildschweinen auftrat, erscheint eine direkte Beteiligung an der Pathogenese intestinaler Erkrankungen bei Schweinen unwahrscheinlich. Denkbar erscheint aber, dass *paa* durch die verstärkte Adhärenz am Darmepithel zur Kolonisation des Darms beiträgt und somit auch verhältnismäßig häufig aus dem Darm gesunder Tiere isoliert werden kann. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch die These, dass *paa* in Kombination mit anderen Virulenzgenen die Virulenz eines *E. coli*-Stammes verstärken könnte. Zusammen mit anderen Virulenzgenen trat *paa* unter den für diese Arbeit untersuchten *E. coli* allerdings nur sporadisch in Verbindung mit *sepA* und *escV* (ein Stamm) sowie mit *fedA* (ein Stamm) auf.

AidA-I stellt ein weiteres plasmidkodiertes Nicht-Fimbrien-Adhäsion dar, welches zur bakteriellen Anheftung an die äußere Membran der Wirtsepithelzellen beiträgt und häufig in PWD oder ED verursachenden *E. coli*-Stämmen, aber auch in kommensalen porzinen *E. coli* nachgewiesen werden kann [151]. Fünf (4,9 %) der 102 untersuchten *E. coli*-Stämme vom

Wildschwein besaßen *aidA-I*. Auch in kommensalen Hausschwein-*E. coli* wurde *aidA-I* zwischen 1 % und 15 % nachgewiesen, wohingegen 67,8 % der porzinen STEC und 56,3 % der mit PWD und ED assoziierten *E. coli aidA-I* aufwiesen [12, 28, 151]. Das Gen scheint also bei kommensalen *E. coli*-Stämmen weniger verbreitet, aber trotzdem sporadisch vorhanden zu sein. Da *aidA-I* bisher selten in *E. coli*, die aus Stuhlproben von an Diarrhoe erkrankten Menschen isoliert worden waren, nachgewiesen wurde [98, 99], könnten sowohl die Haus- als auch die Wildschweinpopulation als mögliches Erregerreservoir dienen.

SepA wird zu den „Serine Protease Autotransporter Of Enterobacteriaceae“ (SPATE) gezählt und gehört wie auch *pic* und *tsh* zur Klasse der nicht-cytotoxischen SPATE. Zunächst wurde es bei *Shigella flexneri*, dann auch bei ETEC und anderen *E. coli*-Stämmen beschrieben [16]. Das durch die äußere Membran translozierte Toxin darmpathogener *Escherichia coli* kann zu entzündlichen Reaktionen an der Darmmukosa führen. Bei ETEC konnten Boerlin et al. *sepA* in 93,0 % der Fälle nachweisen, bei kommensalen *E. coli* nur zu 2,0 % [28]. Diese geringere Nachweisrate bei kommensalen *E. coli* gleicht den hier generierten Daten vom Wildschwein. Fünf (4,9 %) *E. coli*-Isolate vom Wildschwein waren *sepA*-positiv.

6.2.3 ExPEC-typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs)

Der Darm bietet einer Vielzahl von Bakterien Lebensraum. Um im Wettstreit um knappe Ressourcen wie z. B. Nährstoffe und Bindungsstellen an der Darmmukosa zu bestehen, könnte der Besitz verschiedener Virulenzfaktoren, bspw. von Adhäsinen, Toxinen, Eisenakquirierungssystemen, Lipopolysacchariden, Polysaccharidkapseln und Invasinen von Vorteil sein. Über das Vorkommen ExPEC-typischer virulenzassoziiierter Gene (VAGs) in intestinalen *E. coli* existieren bisher nur wenige Untersuchungen. Schierack et al. vermuteten jedoch, dass diese einen wichtigen, wenn auch nicht essentiellen Beitrag zur Kolonisation des Darms leisten [153, 186]. Um die Verbreitung der ExPEC-typischen VAGs zu untersuchen, wurden alle 102 *E. coli*-Isolate der von Ewers et al. etablierten, 34 VAGs umfassenden mPCR unterzogen [63]. Die hierbei generierten Daten wurden, sofern nicht anders angegeben, mit den Ergebnissen von Schierack et al. [186] bezüglich der Verbreitung der VAGs in kommensalen, porzinen *E. coli*-Stämmen verglichen. Zusätzlich wurden in Tab. 24 die von Ewers et al. [63] untersuchten, extraintestinal-pathogenen *E. coli* aus Menschen und Vögeln hinsichtlich des Vorkommens virulenzassoziiierter Gene aufgeführt, um ein detaillierteres Gesamtbild über die Häufigkeit von VAGs in *E. coli* verschiedenster Herkunft zu erlangen.

Tab. 24 Vergleichendes Vorkommen von virulenzassoziierten Genen (VAGs), die für extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC) typisch sind

VAG(s) geordnet nach Kategorien	Häufigkeit virulenzassoziiierter Gene (%)					
	vorliegende Arbeit	Schierack et al. (2008)	Ewers et al. (2007)			
			ExPEC (gesamt)	APEC	UPEC	NMEC
Adhäsine						
<i>afa/dra</i>	0,0	0,0	2,0	1,3	6,1	3,8
<i>crlA</i>	88,2	100,0	93,4	92,7	97,0	96,2
<i>fimC</i>	100,0	79,4	95,8	94,9	100,0	100,0
<i>hra</i>	22,6	13,2	27,4	23,5	53,0	30,8
<i>iha</i>	4,9	0,0	6,8	3,1	22,7	30,8
<i>mat</i>	46,1	77,9	93,1-100,0	k. A.	k. A.	k. A.
<i>papC</i>	1,0	1,5	29,6	24,6	50,0	65,4
<i>sfa/foc</i>	4,9	0,0	14,6	8,8	50,0	26,9
<i>tsh</i>	3,9	5,9	46,8	54,9	4,5	11,5
Eisenaufnahmesysteme						
<i>chuA</i>	37,3	11,8	56,3	50,3	81,8	96,2
<i>fyaA</i>	28,4	19,1	65,3	66,4	56,1	69,2
<i>ireA</i>	2,9	0,0	38,4	41,3	19,7	34,6
<i>iroN</i>	11,8	13,2	81,7	83,7	72,7	69,2
<i>irp2</i>	19,6	19,2	71,7	68,8	81,8	96,2
<i>iucD</i>	1,0	11,8	73,1	79,3	33,3	65,4
<i>sitD chr.</i>	10,8	1,5	36,3	31,6	56,1	69,2
<i>sitD ep.</i>	4,9	10,3	65,5	73,2	21,2	42,3
Protektine						
<i>cvi/cva</i>	5,9	11,8	62,9	72,3	12,1	26,9
<i>iss</i>	2,9	11,8	75,7	84,0	25,8	57,7
<i>kpsMTII</i>	23,5	10,3	44,6	42,2	41,0	96,0
<i>neuC</i>	0,0	0,0	30,0	29,5	9,1	92,3
<i>ompA</i>	100,0	98,5	98,3	99,1	92,4	100,0
<i>traT</i>	44,1	61,8	77,3	81,3	50,0	76,9
Toxine						
<i>astA</i>	39,2	14,7	17,4	20,0	6,1	0,0
<i>cnf1/2</i>	11,8	k. A.	5,7	0,9	31,8	23,1
<i>hlyA</i>	2,9	4,4	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
<i>sat</i>	2,9	0,0	4,5	0,4	21,2	34,6
<i>vat</i>	6,9	1,5	42,1	39,8	54,5	50,0
Invasine						
<i>gimB</i>	0,0	0,0	23,7	23,7	9,1	61,5
<i>ibeA</i>	14,7	5,9	25,8	26,2	18,2	38,5
<i>tia</i>	5,9	1,5	25,7	23,7	31,8	46,2
Sonstige						
<i>malX</i>	14,7	1,5	44,3	39,6	65,2	73,1
<i>pic</i>	6,9	1,5	13,7	11,2	33,3	7,7

In Spalte 1 sind 33 VAGs aufgeführt, deren durchschnittliches Vorkommen in den 102, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 102 *E. coli*-Isolaten von Wildschweinen (Spalte 2) mit dem Vorkommen in 68 *E. coli*-Isolaten von Hausschweinen (Spalte 3, Schierack et al. [186]) sowie dem Vorkommen in 526 ExPEC (436 aviär-pathogene *E. coli* (APEC), 65 uropathogene *E. coli* (UPEC), 25 mit neonataler Meningitis-assoziierte *E. coli* (NMEC)) (Spalte 4, Ewers et al. [63]) verglichen wird.

6.2.3.1 Vergleichendes Vorkommen der Adhäsingene

Adhäsine ermöglichen es den Bakterien, an Zellen bzw. an Geweben des Wirtsorganismus anzuheften, um einer Abschwemmung zu entgehen und eine erfolgreiche Kolonisation oder auch Infektion einzuleiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorkommen von neun, bei ExPEC häufig vorkommenden Adhäsingenen untersucht.

FimC kodiert für die Typ 1-Fimbrie, die unabhängig von einer Pathogenität, bei vielen *E. coli*-Stämmen vorkommt. Alle Wildschwein-*E. coli* wiesen dieses Gen auf. In kommensalen *E. coli* vom Hausschwein kam es bei 79,4 % der Stämme vor, war aber bei fast allen von Ewers et al. untersuchten ExPEC-Stämmen vorhanden. *Crl* kodiert für die Curli-Fimbrien und war zwar bei allen Hausschwein-*E. coli*, aber nur bei 88,0 % der Wildschwein-*E. coli* nachweisbar. Das für ein hitzeresistentes, äußeres Membranprotein kodierende Gen *hra* war in Wildschwein-*E. coli* häufiger als in *E. coli* aus Hausschweinen vertreten, aber etwa genau so verbreitet wie in APEC Stämmen. Genau umgekehrt verhielt es sich mit *mat*, einem Gen, welches für ein temperatursensibles, mit Meningitis assoziiertes Fimbrien-Adhäsion kodiert. Das nur sporadische Vorkommen von *iha* (kodiert für ein eisenreguliertes Adhäsion), *papC* (kodiert für die P-Fimbrie), *sfa/foc* (kodiert für die S-Fimbrie bzw. die F1C-Fimbrie) und *tsh* (kodiert für ein temperatursensitives Hämagglutinin) trifft sowohl für *E. coli* vom Haus- als auch vom Wildschwein zu [186, 220]. Allerdings kamen diese vier Gene deutlich häufiger bei ExPEC-Stämmen vor, wo sie in Verbindung mit der Adhäsion am Nieren- und Atemepithel und der Agglutination von Erythrozyten gebracht werden. Bezüglich der Verbreitung der neun untersuchten Adhäsingene lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Haus- und der Wildschweinpopulation darstellen. Einzig der Nachweis von *mat*, einem häufig bei *E. coli* unabhängig von der Pathogenität vorkommenden Gen, dessen Expression an der Zelloberfläche bisher nur bei NMEC-Stämmen unter niedrigeren Temperaturen nachgewiesen wurde [167], lag bei Hausschwein-*E. coli* mit über 75 % deutlich höher als bei den Wildschwein-*E. coli* mit 46,1 %. Generell sind die Adhäsingene jedoch bei ExPEC unter Berücksichtigung der Anpassung an den extraintestinalen Raum weiter verbreitet als bei kommensalen *E. coli*.

6.2.3.2 Vergleichendes Vorkommen der Eisenakquirierungsgene

Eisen ist ein wichtiger und im GIT – gemessen an den bakteriellen Bedürfnissen – selten vorkommender Wachstumsfaktor, der für die Replikation, die DNA-Synthese und generell bei allen am Elektronentransport beteiligten Vorgängen benötigt wird [181]. Spezielle bakterielle Eisenaufnahmesysteme ermöglichen es den Darmbakterien, im Wettkampf um diese limitierte

Ressource zu bestehen. Eine hohe Anzahl an Genen für die Eisenakquirierung bietet also Vorteile bei der Kolonisation des GIT. Für diese Arbeit wurde das Vorkommen von neun mit der Eisenakquirierung verbundenen Genen untersucht. Im Gegensatz zu ExPEC-Stämmen waren diese Eisenakquirierungsgene sowohl bei kommensalen Wildschwein-*E. coli* als auch bei denen vom Hausschwein verhältnismäßig selten vertreten. Über 30 % der untersuchten *E. coli*-Stämme wiesen keines der untersuchten Eisenakquirierungsgene auf und müssen das benötigte Eisen auf andere Art und Weise aufnehmen. Am häufigsten konnte unter den restlichen Stämmen *feoB*, das für ein Eisen(II)-Aufnahmesystem kodiert, nachgewiesen werden. *ChuA* kam in mehr als einem Drittel der Stämme von Wildschweinen vor. 28,4 % der Wildschwein-*E. coli* besaßen außerdem das mit dem Yersiniabactin-Siderophore-System assoziierte Gen *fyuA*, das nur 14,5 % bis 19,1 % der kommensalen *E. coli* von Hausschweinen aufwiesen [186, 220]. Die beiden Gene *iroN* (kodiert für die Siderophore Salmochelin) und *irp2* (kodiert zusammen mit anderen Genen für das Yersiniabactin) kamen bei 10 % bis 20 % der Wildschwein-*E. coli* vor, was der Häufigkeit in Hausschwein-*E. coli* entspricht. *SitD chr.* (kodiert für das *Salmonella iron transport system*) war jedoch bei über 10 % der *E. coli* von Wildschweinen gegenüber 1,5 % *E. coli* von Hausschweinen nachweisbar. Im Vergleich zu kommensalen *E. coli*-Stämmen von Hausschweinen besaßen Wildschwein-*E. coli* durchschnittlich eines (Spannweite: null bis sechs) von neun Eisenakquirierungsgenen. Hausschwein-*E. coli* hingegen wiesen im Durchschnitt kein Eisenakquirierungsgen auf (Spannweite: null bis fünf) [186]. Diese Abweichungen könnten einerseits auf dem geringen Probenumfang und einem damit verbundenen statistischen Zufall beruhen. Andererseits könnte das mit Eisen angereicherte Futter in der konventionellen Schweinehaltung zu durchschnittlich höheren Eisenkonzentrationen im Darm von Hausschweinen führen, so dass zusätzliche Eisenakquirierungssysteme im bakteriellen Konkurrenzkampf um diesen Wachstumsfaktor weniger Vorteile bringen würden. Daher könnten die dafür notwendigen Gene seltener unter den Hausschwein-*E. coli* verbreitet sein. Bei ExPEC-Stämmen hingegen scheinen, anders als bei kommensalen intestinalen *E. coli*, viele verschiedene Eisenakquirierungssysteme vorzukommen. Es stellt sich nun die Frage, ob die für ExPEC-typischen Eisenaufnahmesysteme bedeutsam für die Besiedlung des Darms sind oder aber ausschließlich als zusätzliche Eisenaufnahmesysteme bei der Kolonisation des extraintestinalen Raums fungieren. Gleichwohl stellt der Besitz mehrerer Eisenakquirierungssysteme auch im GIT einen Vorteil im Wettstreit um den Wachstumsfaktor Eisen dar.

6.2.3.3 Vergleichendes Vorkommen der Toxingene

Weiterhin wurde das Vorkommen von fünf verschiedenen Toxingenen bei den 102 zur Verfügung stehenden *E. coli*-Stämme überprüft. Das durch das Gen *astA* kodierte, hitzestabile Enterotoxin 1 (*EAST1*) wurde zunächst bei EaggEC beschrieben und in Zusammenhang mit Diarrhoe bei Kindern gebracht [54]. Allerdings wurde es auch bei porzinen, darmpathogenen *E. coli* nachgewiesen und ist in den Schweinebeständen sowohl aus dem Darm von an ND, PWD und ED erkrankten als auch aus klinisch unauffälligen Schweinen isoliert worden [42, 69, 150]. *EAST1* scheint daher nur in Kombination mit Adhäsinen, die die Adhäsion an der intestinalen Mukosa ermöglichen, und in Verbindung mit der Bildung eines mukoiden Biofilms die Darmwand schädigen zu können [116]. Für kommensale *E. coli* aus Schweinebeständen sind bisher Nachweisraten von 5,1 % bis maximal 30,0 % beschrieben worden [28, 41, 186, 220]. Unter den untersuchten 102 Wildschwein-*E. coli* waren 40 (39,2 %) Stämme *astA*-positiv. Um zu überprüfen, ob dieses Gen unter den Wildschwein-*E. coli* verbreiteter als unter den Hausschwein-*E. coli* ist oder aber, ob die erhobenen Daten auf einer zufälligen Häufung beruhen, sollte der Probenumfang ausgedehnt werden. Zu klären bleibt außerdem, warum *astA* in *E. coli* von Wildschweinen derart häufig vorkommt, ob *EAST1* außer der Funktion als Toxin andere Eigenschaften besitzt oder ob das Auftreten von *astA* mit anderen, eventuell auf dem gleichen Plasmid liegenden Genen korreliert ist. Ein Zusammenhang mit den für diese Arbeit untersuchten Genen konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Das häufig mit UPEC assoziierte, chromosomal liegende *cnf1/2* kodiert die Cytonekrosefaktoren 1 und 2, die die Adhäsion und die Invasion des Blasenepithels unterstützen. Das Gen wurde bei 11,7 % der Wildschwein-*E. coli* nachgewiesen, was etwa den Nachweisraten von Blanco et al. bei gesunden Rindern entspricht [25]. Untersuchungen zum Vorkommen von *cnf1/2* bei klinisch unauffälligen Hausschweinen fehlen bisher. Es wurde jedoch auch aus kommensalen *E. coli* aus dem Darm gesunder Menschen sporadisch isoliert [55].

Durch die Gene *sat* und *vat* werden SPATE der Klasse 1 kodiert, die cytotoxisch auf Epithelzellen wirken. Beide traten sowohl unter den Wildschwein- als auch unter den von Schierack et al. untersuchten Hausschwein-*E. coli* nur sporadisch auf, können aber regelmäßig aus UPEC und NMEC isoliert werden. *HlyA* kodiert ein 100kDa Cytolysin, das α -Hämolyisin. Der Beitrag dieses Cytolysins zur Pathogenität von *E. coli in vivo* ist bisher ungeklärt [143]. Untersuchungen von Troeger et al. zeigten *in vitro*, dass durch das

α -Hämolyisin kleinste Defekte an Kolonepithelzellen von Ratten ausgelöst wurden, die eine Translokation von *E. coli* begünstigen und es ExPEC ermöglichen könnten, die Blutbahn zu erreichen [209]. Ob diese Defekte im Kolonepithel zwangsläufig zu einer Translokation der Bakterien führen oder aber als zusätzliche Anheftungsstellen für *E. coli* die Kolonisation des Darms durch *hlyA*-positive *E. coli*-Stämme fördern, bleibt zu klären. Allerdings wurde das Gen *hlyA* sowohl bei den für diese Arbeit untersuchten Wildschwein-*E. coli* als auch durch Untersuchungen anderer Autoren bisher nur sporadisch bei kommensalen, intestinalen *E. coli* des Schweins nachgewiesen [41, 50, 186, 220].

6.2.3.4 Vergleichendes Vorkommen der Gene für die Serumresistenz

Um einer Phagozytose oder dem direkten Zelltod durch die im Serum vorhandenen Faktoren des Wirtsabwehrsystems wie Immunglobuline, Lysozyme, Transferrine und das Komplementsystem zu entgehen, können Bakterien verschiedene, mit der Serumresistenz assoziierte Virulenzfaktoren aufweisen. Dazu zählen bspw. Lipopolysaccharide, verschiedene Kapseln und Oberflächenproteine. Das für ein äußeres Membranprotein kodierende *ompA* dient im Allgemeinen dem Zusammenhalt von Peptidoglycanen und der äußeren Membran und macht das Bakterium z. B. widerstandsfähiger gegenüber Gallensäuren [214]. Es ist sowohl unter pathogenen als auch kommensalen *E. coli* weit verbreitet und konnte in allen Wildschwein-*E. coli* nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden für kommensale Hausschwein-*E. coli* und ExPEC-Stämme erzielt. Auch *traT*, das für die Bildung eines, die Antigenerkennung behindernden Oberflächenlipoproteins zuständig ist, ist unabhängig von den Pathotypen häufig nachweisbar. Zu 48,7 % bis 61,8 % ist *traT* unter den kommensalen, porzinen *E. coli* verbreitet [41, 186, 220], während es 42,2 % der *E. coli* vom Wildschwein aufwies. Bei *E. coli*-Stämme aus an PWD und ND erkrankten Schweinen trat es bei mehr als 65 % der untersuchten Stämme auf [41].

Anders verhielt es sich mit *kpsMTII*, einem Gen, das an der Biosynthese der Polysaccharide für den Kapseltyp II beteiligt ist und in den meisten NMEC-Stämmen nachgewiesen werden kann. *E. coli*, die diese Polysaccharidkapsel vom Typ II ausbilden, werden vom Immunsystem des Wirtstieres schlechter erkannt. Eine starke und lang anhaltende, protektive Antikörperausschüttung unterbleibt daher. Dies könnte zu einer erhöhten Tenazität der *kpsMTII*-positiven *E. coli* beitragen. Während das Vorkommen von *kpsMTII* bei einigen Autoren unter den kommensalen, porzinen *E. coli* mit Werten von 0,6 % bis 10,3 % angegeben wird, wiesen *E. coli* vom Wildschwein dieses Gen zu 23,5 % auf. Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit dieses Gen in den kommensalen, aus gesunden Wildschweinen

isolierten *E. coli*-Stämmen tatsächlich exprimiert wird. Wenn *kpsMTII* jedoch exprimiert wird, scheint es bedeutsam für die Virulenz eines Stammes zu sein. Li et al. wiesen im Hühnerversuch mit *kpsMT*-Deletionsmutanten des APEC-Stamms IMT 5155 eine deutlich verringerte Virulenz nach [124]. Die mit dem *Col V*-Plasmid assoziierten Strukturgene des Colicin V-Operons *cvi/cva* und das für ein äußeres Membranprotein kodierende *iss*-Gen waren unter den Wildschwein-*E. coli* nur sporadisch nachzuweisen. Bei *E. coli* von gesunden Hausschweinen kamen sie mit Nachweisraten von 11,8 % geringfügig häufiger vor, wohingegen insbesondere APEC-Stämme, unter denen *Col V*-Plasmide weit verbreitet sind, diese Gene zu über 70 % aufweisen. Dieses Plasmid, auf dem Gene für das Aerobactin-Eisenaufnahmesystem, die Komplementresistenz und die Colicinproduktion liegen, scheint deutlich seltener unter kommensalen *E. coli*-Stämmen verbreitet zu sein. Da das Gen *iss* aber auch chromosomal lokalisiert sein kann [107], müssen *iss*-positive kommensale Stämme nicht zwangsläufig das Plasmid besitzen.

6.2.3.5 Vergleichendes Vorkommen der Gene für die Invasion

Das auf der Genetischen Insel *GimA* liegende Gen *ibeA* ist an der Invasion des Hirnendothels beteiligt [63, 71] und kann sowohl in NMEC- als auch in APEC-Stämmen regelmäßig nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu scheint es in kommensalen porcinen und humanen *E. coli* nur selten vorzukommen [55, 186]. Allerdings war das Gen im Rahmen dieser Arbeit in 14,7 % der *E. coli* vom Wildschwein nachweisbar. Weitere Studien sind notwendig, um das Vorkommen dieses meist nur in pathogenen *E. coli*-Stämmen vorkommenden Gens und seine Funktion in *E. coli* aus der Wildtierpopulation zu klären. Das vermutlich ebenfalls am Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke beteiligte Gen *gimB* trat weder bei den untersuchten Wildschwein- noch in Hausschwein-*E. coli* auf, sehr wohl aber bei NMEC-Stämmen [63]. Nur sporadisch war *tia*, das ein Membranprotein für die Anheftung und Invasion von Epithelzellen kodiert in *E. coli* von Haus- und Wildschweinen nachweisbar. Ähnlich verhielt es sich mit *pic*, das nach Expression zur Bildung einer mucinolytischen Serinprotease führt und so zur intestinalen Kolonisation beiträgt. Interessanterweise war *malX*, der Marker einer Pathogenitätsinsel des UPEC-Stamms CFT073, in 14,7 % der Wildschwein-*E. coli* nachweisbar. Dieses Gen, das zunächst in humanpathogenen Stämmen nachgewiesen worden war [106], scheint sowohl in Wildschwein-*E. coli* als auch in aviärpathogenen Stämmen vorzukommen.

6.2.3.6 Korrelationen zwischen der phylogenetischen Gruppe B2 und VAGs

Unter den 34 untersuchten ExPEC-spezifischen Genen war bei 16 Genen eine positive Korrelation zur phylogenetischen Gruppe B2 feststellbar ($p < 0,05$). Der ausschließliche oder signifikant häufigere Nachweis von *sfa/foc* (Adhäsingen), *fyuA*, *ireA*, *irp2*, *sitD chr.* (Gene für die Eisenakquirierung), *kpsMTII* (Serumresistenzgen), *vat* (Toxingen), *ibeA* (Invasionsgen) sowie dem Pathogenitätsmarker *malX* in *E. coli*-Stämmen der Gruppe B2 wurde bereits von anderen Autoren für ExPEC-Stämme beschrieben [63, 141, 171]. Die von diesen Autoren ebenfalls geschilderte positive Korrelation von *E. coli*-Stämmen der Gruppe B2 mit *papC*, *neuC*, *hlyA* und *gimB* konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Gene *iroN*, *cnf1/2* und *tia* waren jedoch durchaus auch in Stämmen anderer Phylogruppen vertreten und nicht, wie bei den ExPEC-Stämmen beschrieben, mit der Gruppe B2 assoziiert.

Das gehäufte Auftreten von virulenzassoziierten Genen in der ECoR-Gruppe B2 wurde bereits von mehreren Autoren aufgezeigt [24, 31, 33, 102, 161]. Ursächlich hierfür könnte einerseits der kurz nach der Abspaltung der ECoR-Schwestergruppen D und des A+B1-Clusters stattgefundenen Erwerb verschiedener virulenzassoziierten Gene durch Stämme der Gruppe B2 sein [101]. Da die Virulenzfaktoren zum größten Teil auf Plasmiden, Pathogenitätsinseln oder Phagen liegen und daher horizontal übertragen werden können [82], müssten sich die Virulenzfaktoren nach und nach auf die übrigen ECoR-Gruppen ausbreiten. Eine andere Möglichkeit ist die Existenz besonderer Eigenschaften im Genom von B2-Stämmen, die die Kompatibilität für die initiale Akquirierung oder aber die Einbehaltung erworbener virulenzassoziierten Gene erhöhen [60]. Weitere Studien sind notwendig, um zwischen beiden Hypothesen zu wählen und den genetischen Hintergrund der Virulenz von ExPEC-Stämmen zu ergründen.

6.2.4 Das Adhäsionsvermögen kommensaler *E. coli* von Wild- und Hausschweinen

Um das Adhäsionsverhalten kommensaler, intestinaler *E. coli*-Stämme aus Wild- und Hausschweinen zu untersuchen und zu vergleichen, wurden *in vitro*-Adhäsionsversuche mit der porzinen Darmepithelzelllinie IPEC-J2 durchgeführt [183]. Von den 102 untersuchten Wildschwein-*E. coli* wurden 30 Stämme zufällig ausgewählt und in einem Adhäsionsversuch eingesetzt, der pro Stamm dreimal wiederholt wurde. Ebenso wurde mit 30 bereits in der Stammsammlung des IMT gelagerten *E. coli*-Stämmen von Hausschweinen verfahren. Als Kontrollstämme wurden der K12-Laborstamm MG 1655 und der apathogene, probiotische

E. coli-Stamm Nissle 1917 (EcN), der in vorhergehenden Untersuchungen im Vergleich mit anderen kommensalen *E. coli*-Stämmen aus Hausschweinen die höchste Adhäsionsrate aufgewiesen hatte [111], eingesetzt.

6.2.4.1 Das Adhäsionsvermögen von Wildschwein-*E. coli*

Die ermittelten Adhäsionsraten innerhalb der *E. coli*-Population der Wildschweine wiesen hohe Schwankungen auf. Während die Hälfte der Stämme eine Adhäsionsrate zwischen der von MG 1655 (0,25 Bakterien/IPEC-J2 Zelle) und EcN (3,2 Bakterien/IPEC-J2 Zelle) aufwiesen, lagen neun *E. coli*-Stämme darunter (<0,25 Bakterien/IPEC-J2 Zelle) und sechs Stämme zeigten teilweise eine deutlich höhere Adhäsionsrate als EcN (bis zu 26,2 Bakterien/IPEC-J2 Zelle).

Die Adhäsion an Epithelzellen wird über eine Bindung bakterieller Adhäsine an die Rezeptoren der Wirtszelle vermittelt. Diese Rezeptoren stellen meist Kohlenhydratanteile der Glykolipide und -proteine in der extrazellulären Matrix und der Zellmembran dar. Die gerade bei schweinepathogenen *E. coli*-Stämmen häufig vorkommenden Gene für die Fimbrienadhäsine K88, K99, P987 und F41 [69] konnten in den untersuchten Wildschwein-*E. coli* nicht nachgewiesen werden. Nur ein Stamm besaß das Gen für die F18-Fimbrie. Abgesehen davon wiesen sowohl alle untersuchten *E. coli* als auch der Kontrollstamm EcN das Gen *fimC* für die Typ1-Fimbrie auf, welche an α -D-Mannosereste der Zelloberfläche bindet. Ebenso wie *fimC* kam auch *crl*, das Gen für die Curlifimbrien, in fast allen *E. coli*-Stämmen vor, so dass die unterschiedlichen Adhäsionsraten dadurch nicht zu erklären sind. Für die durch das *foc*-Gen kodierte F1C-Fimbrie ist eine Beteiligung an der Kolonisation des Urogenitaltrakts beschrieben [8] und Kleta et al. wiesen nach, dass EcN über diese Fimbrie an IPEC-J2-Zellen haftet [111]. Allerdings wiesen nur zwei der eingesetzten 30 Wildschwein-*E. coli* dieses Gen auf. Beide Stämme waren adhärenter als der EcN. Trotzdem zeigten auch Stämme ohne dieses Gen hohe Adhäsionsraten. Desgleichen kam auch nur bei zwei der fünf Stämme mit den höchsten Adhäsionsraten das Gen *iha* vor, das im Urogenitaltrakt bei Mäusen an der Adhäsion beteiligt ist [105, 123]. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Adhäsingene scheinen also nicht alleinige Ursache für eine überaus starke Adhäsion zu sein.

Eine statistisch belegte, positive Korrelation ergab sich nach Auswertung der Daten nur zwischen dem Adhäsionsvermögen und dem Vorkommen des Eisenakquirierungsgens *chuA* sowie den ECoR-Gruppen B2 und D. *ChuA* dient bei der Triplex-PCR nach Clermont et al. zur Einteilung der *E. coli*-Stämme in die phylogenetischen Gruppen B2 und D. Vertreter der

vier ECoR-Gruppen unterscheiden sich in phänotypischen Merkmalen (Zuckerverwertung, Antibiotikaresistenzmuster, temperaturabhängiges Wachstum) [77]. Ebenso scheinen einige virulenzassoziierte Gene (VAGs) insbesondere mit den ECoR-Gruppen B2 und D assoziiert zu sein, wie es auch für die untersuchten *E. coli*-Isolate der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde [33, 60, 102]. Außerdem zeigten Bergthorsson et Ochman, dass Vertreter der ECoR-Gruppe B2 und D ein signifikant größeres Genom aufweisen als Vertreter der ECoR-Gruppe A [19, 208]. *E. coli*-Stämme der ECoR-Gruppen B2 und D scheinen daher einen von den anderen beiden Gruppen abweichenden (zusätzlichen) genetischen Hintergrund zu besitzen. Es könnten also Gene und Faktoren, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, aber mit den ECoR-Gruppen B2 und D assoziiert sind, zur einer Erhöhung des Adhäsionsvermögens von *E. coli*-Stämmen im Darm beitragen. Ob das Eisenakquirierungsgen *chuA* direkt an der Adhäsion beteiligt ist oder aber nur als „Indikator“ für Vertreter der ECoR-Gruppen B2 und D dient, könnte durch den Einsatz von *chuA*-Deletionsmutanten im *in vitro*-Adhäsionsassay überprüft werden.

6.2.4.2 Vergleich des Adhäsionsvermögens von Wild- und Hausschwein-*E. coli*

Wie von Schierack et al. für kommensale *E. coli* aus Hausschweinen beschrieben [183], zeigten auch die hier untersuchten *E. coli* aus dem Darm gesunder Hausschweine ein sehr heterogenes Adhäsionsverhalten. Über 80 % der Stämme waren weniger adhären als der MG 1655. Allerdings konnte auch ein Stamm gefunden werden, der sich adhärenter als der EcN erwies. Insgesamt entsprechen diese Daten aber den Untersuchungen von Schierack et al., die auch nach vierstündiger Inkubation von kommensalen, porzinen *E. coli* in 74 % der Stämme Adhäsionsraten von unter einem Bakterium/IPEC-J2-Zelle vorfanden.

Die Anzahl adhärenter Hausschwein-*E. coli* lag bei durchschnittlich $1,21 \times 10^5$ Bakterien/Well, was 0,5 % der inokulierten *E. coli* entspricht. Wildschwein-*E. coli* hingegen waren im Mittel zu 2,7 % adhären ($6,82 \times 10^5$ Bakterien/Well). Diese Unterschiede im Adhäsionsverhalten von bis zu einer halben Zehnerpotenz könnten in der verwendeten Stichprobe begründet sein. Die 30 Wildschwein-*E. coli* stammten zwar aus regional getrennt liegenden Jagdgebieten, bei den für die Adhäsionsversuche eingesetzten Hausschwein-*E. coli* handelte es sich jedoch um Stämme aus einem einzigen Schweinebestand, in dem eventuell weniger gut adhären *E. coli* verbreitet waren.

Ein besseres Adhäsionsvermögen scheint für *E. coli* bei frei lebenden Wildtieren allerdings von Vorteil zu sein. Weniger gut adhären *E. coli* passieren den GIT der Tiere eventuell nur und werden schnell ausgeschieden. In der konventionellen Tierhaltung stellt dies für die

E. coli-Stämme möglicherweise keinen Nachteil dar, da sie aufgrund der hohen Haltungsdichte auf engstem Raum und dem ständigen Kontakt der Hausschweine zu ihren Ausscheidungen erneut dasselbe Wirtstier oder aber ein anderes Tier des Bestands besiedeln können. Der Lebensraum von Wildschweinen erstreckt sich hingegen auf ein wesentlich größeres Gebiet und die Tiere haben kaum Kontakt zu dem von ihnen abgesetzten Kot. Eine erneute Besiedlung des Darms durch über im Kot vorhandene *E. coli* ist also unwahrscheinlicher. Daher könnte ein besseres Adhäsionsvermögen den *E. coli* von Wildtieren dazu verhelfen, länger ihr Primärhabitat – den Darm von Warmblütern mit optimalen Lebensbedingungen – zu besiedeln.

6.2.5 Vergleich der Kohlenhydratverwertung mittels API 50 CH-System bei Wild- und Hausschwein-*E. coli*

Der Darm der Säugetiere bietet einer Vielzahl von Bakterien ein vielfältiges Spektrum an Nährstoffen. Die meisten Bakterien benötigen fermentierbare Kohlenhydrate für Wachstum, Vermehrung und die damit verbundene Kolonisation des Darms. Mit der Nährstoff-Nischen-Theorie postulierte Freyer, dass durch die Nährstoffverfügbarkeit im Darm die Anzahl verfügbarer ökologischer Nischen bestimmt wird [68]. Demzufolge bevorzugen die meisten Mikroorganismen eines bzw. nur wenige Substrate aus der verdauten Nahrung, aus Epithel- und Zellresten oder aus der dem Epithel aufliegenden Mukusschicht und besetzen auf diese Art individuelle Nischen. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass auch innerhalb der *E. coli*-Population Unterschiede zwischen den einzelnen *E. coli*-Stämmen in der Verwertung verschiedener Kohlenhydrate existieren [57, 137]. Katouli et al. teilten *E. coli*-Stämme aus Ferkeln aufgrund ihres unterschiedlichen biochemischen „Fingerabdrucks“ bei der Verstoffwechslung von 24 Kohlenhydraten in verschiedene biochemische Phänotypen ein [109]. *E. coli* kommen im Darm sowohl in der Mukusschicht vor als auch im Darminhalt, wo mit der Nahrung aufgenommene, für das Wirtstier unverdauliche Polysaccharide von anaeroben Mikroorganismen zu Monosacchariden abgebaut werden können, die das Wachstum vieler Darmbakterien unterstützen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Kohlenhydratverwertung sollte überprüft werden, ob die streng regulierte Fütterung mit standardisierten Futtermitteln in der konventionellen Schweinehaltung gegenüber der abwechslungs- und facettenreicheren Nahrung der Wildschweine Einfluss auf die Kohlenhydratverwertung kommensaler *E. coli*-Stämme besitzt. Hinweise auf den Einfluss der Ernährung auf *E. coli*-Stämme liefern Untersuchungen von Souza et al., die aufzeigten, dass

E. coli von Tieren mit einer speziellen Diät wie Wale, Seekühe und Huftiere weniger Kohlenhydrate verstoffwechseln können als *E. coli* von Vögeln und Nagetieren [199]. In der vorliegenden Arbeit wurde das API 50 CH-System ausgewählt, das 49 verschiedene Kohlenhydrate beinhaltet, darunter auch häufig von anderen Autoren untersuchte Substrate wie Adonitol, Arabinose, Galaktose, Mannose, Maltose, Rhamnose, Sorbitol, Trehalose und Xylose [57, 66, 109, 199]. Problematisch erwies sich beim Einsatz dieses Systems das häufige, durch Farbumschlag des Indikators nach orange und dunkelorange angezeigte Auftreten des Testergebnisses „variabel“, das auch nach Wiederholung des Versuchs erneut auftrat. Kohlenhydrate, deren Verwertung als variabel eingestuft wurde, gingen als nicht-positive Ergebnisse in die Auswertung ein, da keine vollständige Kohlenhydratverstoffwechslung stattgefunden hatte. Die Verstoffwechslung der Kohlenhydrate war einzigartig und hoch divers für jeden kommensalen *E. coli*-Stamm unabhängig vom Wirtstier. 11 der 49 getesteten Kohlenhydrate waren von allen *E. coli* verwertbar. Die durchschnittliche Zuckerverwertung lag bei Wildschwein-*E. coli* mit 23,7 vollständig verwerteten Substraten etwas höher als die von Hausschwein-*E. coli* mit 22,4 Substraten. Allerdings waren auch sechs *E. coli* vom Hausschwein in der Lage, mindestens 24 von 49 untersuchten Kohlenhydraten zu verstoffwechseln. Das pflanzliche Polysaccharid Methyl- β D-Xylopyranosid konnte von keinem *E. coli* vollständig verstoffwechselt werden, von sechs Wildschwein-*E. coli* war das Testergebnis jedoch variabel. Am deutlichsten zeigten sich Unterschiede bei der Ketohehexose D-Tagatose auf, die in geringer Menge in Milchprodukten vorkommt und nach hydrolytischer Spaltung von Laktose aus Galaktose isomerisiert werden kann. Diese konnten von keinem Hausschwein-*E. coli*, aber von 13 Wildschwein-*E. coli* vollständig verwertet werden. Ob die Unterschiede in der Kohlenhydratverwertung wirklich ein Ergebnis des unterschiedlichen, fütterungsbedingten Selektionsdrucks sind, ist unklar. Dazu wären weitere Untersuchungen mit einem erhöhten Stichprobenumfang notwendig, für die z.B. jene Kohlenhydrate verwendet werden könnten, bei denen sich in der vorliegenden Arbeit die größten Unterschiede zwischen *E. coli* von Wild- und Hausschweinen ergeben haben. Bedacht werden muss jedoch auch, dass *E. coli* nicht ausschließlich auf die mit der Nahrung des Wirtstiers zugeführten Kohlenhydrate angewiesen sind. Wadolkowski et al. zeigten bei Mäusen, dass *E. coli* im Mukus schneller wachsen als im Darminhalt [212]. Die vom Darmepithel gebildete Mukusschicht an sich enthält Komponenten wie Galaktose, Fucose, Mannose, N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure, die *E. coli* zur Kolonisation unabhängig von den mit der Ernährung des Wirtstiers verbundenen Kohlenhydraten nutzen kann.

7. Zusammenfassung

„Vergleichende molekulare, epidemiologische und phylogenetische Untersuchungen zur Anpassung von *Escherichia coli* bei Wild- und Hausschweinen“

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig Daten über die coliforme Mikroflora der Wildschweine sowie grundlegende Erkenntnisse über die Diversität von *E. coli*-Populationen und über das natürliche Vorkommen von Virulenz- und Kolonisationsgenen in nicht vom Menschen beeinflussten Schweinepopulationen zu erhalten. Daher wurden kommensale *E. coli* aus dem Darm von gesunden Wildschweinen geno- und phänotypisch untersucht. Die Ergebnisse wurden mit bereits publizierten Daten kommensaler *E. coli* von Hausschweinen verglichen.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Diversität der *E. coli*-Stämme für jedes Wildschwein individuell und hoch variabel, jedoch geringer als die Diversität von Hausschwein-*E. coli* war. Über die Hälfte der untersuchten Wildschwein-*E. coli* wiesen zudem mindestens eines der für schweinepathogene *E. coli* typischen Virulenzgene auf. Das Toxingen *astA* war in fast der Hälfte aller Stämme nachweisbar. Alle vier ECoR-Gruppen waren in jedem der untersuchten Darmabschnitte vertreten.

Die geno- und phänotypische Charakterisierung der Wildschwein-*E. coli* im zweiten Teil der Arbeit belegte, dass für schweinepathogene *E. coli* typische Virulenzgene bei Wildschwein-*E. coli* nur sporadisch nachgewiesen werden konnten, wohingegen einige für extraintestinal-pathogene *E. coli* (ExPEC) typische, virulenzassoziierte Gene (*mat*, *fyuA*, *sitD chr.*, *astA*, *kpsMTII*, *ibeA*, *malX*) häufiger als bei kommensalen Hausschwein-*E. coli* auftraten. Der Großteil der untersuchten Isolate gehörte den ECoR-Gruppen A und B1 an, wobei die ECoR-Gruppe B2, deren Vertreter deutlich mehr virulenzassoziierte Gene aufwiesen, häufiger als bei kommensalen *E. coli* von Hausschweinen vorkam. Außerdem wiesen *E. coli* von Wildschweinen gegenüber denen von Hausschweinen durchschnittlich höhere Adhäsionsraten an IPEC-J2-Zellen und eine effizientere Verwertung der 49 getesteten Kohlenhydrate auf.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich *E. coli* von Wildschweinen in einigen Eigenschaften von Hausschwein-*E. coli* unterscheiden. Das bessere Adhäsionsvermögen, die effizientere Kohlenhydratverwertung, die geringere Diversität sowie das häufigere Vorkommen von Kolonisationsgenen und der ECoR-Gruppe B2 könnten eine Folge des durch den Menschen eingeleiteten Domestizierungsprozesses und der heutigen konventionellen Schweinehaltung sein.

8. Summary

“Comparative molecular, epidemiologic and phylogenetic analyses concerning the adaptation of *Escherichia coli* in wild boars and domestic pigs”

The main objectives of the present study were to obtain preliminary information about the *E. coli* microflora from wild boars, as well as to get basic knowledge about the diversity and natural occurrence of selected virulence and antimicrobial resistance genes of *E. coli* isolated from pig populations, which are unaffected by humans as far as possible. For this purpose, commensal intestinal *E. coli* from healthy wild boars were analyzed geno- and phenotypically to compare the results with already published data from commensal *E. coli* from domestic pigs.

The first part of this study showed that the diversity of the *E. coli* microflora from wild boars was unique and highly variable but lower than the diversity of *E. coli* from domestic pigs. In addition, more than half of the isolated *E. coli* strains exhibited at least one of the virulence genes which are characteristic for porcine pathogenic *E. coli*. Almost half of the isolated *E. coli* strains possessed the gene *astA* coding for a heat stable cytotoxin. Members of each of the four ECoR-groups were found in all selected sections of the intestine.

The geno- and phenotypical characterization of *E. coli* from wild boars in the second part of this study could prove that for porcine pathogenic intestinal *E. coli* typical virulence genes are only sporadically distributed among *E. coli* from wild boars, whereas some of the virulence associated genes, which are typical for extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (*mat*, *fyuA*, *sitD chr.*, *astA*, *kpsMTII*, *ibeA*, *malX*) occurred more frequently in *E. coli* from wild boars than in those from domestic pigs. The majority of the isolated *E. coli* were members of the ECoR-groups A and B1, whereas the ECoR-group B2, whose members clearly exhibited more virulence associated genes, was represented more frequently than in commensal *E. coli* from domestic pigs. Furthermore, *E. coli* from wild boars showed higher adhesion rates to IPEC-J2-cells on average and a more efficient utilization of 49 tested carbohydrates than those from domestic pigs.

These results suggest that there exist differences between the *E. coli* microflora from wild boars and those from domestic pigs. The enhanced adhesion capacity, more efficient utilization of carbohydrates, lower diversity and more frequent occurrence of colonization genes and of *E. coli* representing the ECoR-group B2 could be a consequence of the domestication process initiated by humans and conventional pig husbandry.

Anhang

Tab. 25 Phänotypische Merkmale der 102 untersuchten *E. coli*-Isolate von Wildschweinen

¹ 0 = unbeweglich; 1 = geringgradig beweglich; 2 = mittelgradig beweglich; 3 = hochgradig beweglich;

² 0 = negativ; 1 = positiv.

IMT- Numer	Beweglich- keit ¹	Hämolyse ²	Laktat- verwertung ²	anaerobe Glykolyse ²	Gasbildung ²	H ₂ S- Bildung ²	Lysin- spaltung ²	Indol- bildung ²	Harnstoff- verwertung ²	Citrat- verwertung ²
16412	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
13127	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16414	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
13122	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16415	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
13100	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
13109	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16416	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16417	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16418	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16419	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16420	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16421	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16422	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16423	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16424	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16425	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16426	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16427	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16428	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16429	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16430	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16431	3	0	1	1	1	0	1	0	0	0
16432	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16433	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
16434	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16435	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16436	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16437	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0

IMT- Nummer	Beweglich- keit ¹	Hämolyse ²	Laktat- verwertung ²	anaerobe Glykolyse ²	Gasbildung ²	H ₂ S- Bildung ²	Lysin- spaltung ²	Indol- bildung ²	Harnstoff- verwertung ²	Citrat- verwertung ²
16438	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16439	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16440	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16441	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16442	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16443	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16444	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16445	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16446	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16447	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16448	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16449	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16450	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16451	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16452	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16453	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16454	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16455	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16456	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16457	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16458	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16459	3	0	1	1	1	0	1	1	0	1
16460	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
14232	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14233	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14234	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14227	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14228	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14229	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14230	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14231	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16461	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16462	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16463	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16464	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16465	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16466	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0

IMT- Nummer	Beweglich- keit ¹	Hämolyse ²	Laktat- verwertung ²	anaerobe Glykolyse ²	Gasbildung ²	H ₂ S- Bildung ²	Lysin- spaltung ²	Indol- bildung ²	Harnstoff- verwertung ²	Citrat- verwertung ²
16467	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16468	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
16469	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16470	3	0	0	1	1	0	1	1	0	0
16471	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16472	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16473	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
16474	2	1	1	1	1	0	1	1	0	0
16475	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16476	3	1	1	0	0	0	1	1	0	0
16477	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16478	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16479	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16480	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16481	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16482	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16483	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16484	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16485	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16486	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16487	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16488	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16489	2	0	1	1	1	0	1	0	0	0
16490	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16491	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
16492	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16493	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16494	3	0	1	1	0	0	0	1	0	0
16495	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16496	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16497	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16498	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16499	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16500	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16501	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
16502	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0

Tab. 26 Virulenzgene der 102 untersuchten *E. coli*-Isolate von Wildschweinen

„0“ = negativ;

„1“ = positiv.

IMT- Nummer	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>escV</i>	<i>bfp</i>	<i>est II</i>	<i>est Ia</i>	<i>fanA</i>	<i>ehtB</i>	<i>fedA</i>	<i>fasA</i>	<i>faeG</i>	<i>fimF41</i>	<i>stx2e</i>	<i>paα</i>	<i>aidA-I</i>	<i>sepA</i>
16412	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16414	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16415	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
13100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16416	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16417	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16418	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16419	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16420	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16422	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16423	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16424	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16425	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16426	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16427	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16432	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16433	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16434	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16436	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16438	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16439	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

IMT- Number	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>escV</i>	<i>bfp</i>	<i>est II</i>	<i>est Ia</i>	<i>junA</i>	<i>eltB</i>	<i>fedA</i>	<i>fasA</i>	<i>fueG</i>	<i>fimF41</i>	<i>stx2e</i>	<i>paa</i>	<i>aidA-I</i>	<i>sepA</i>
16441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16442	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16444	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
16445	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
16446	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16447	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16451	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16452	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16454	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16456	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16458	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16459	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14234	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
14227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14228	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14229	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
14230	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
14231	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
16461	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16462	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16463	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16466	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16467	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16469	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

IMT- Number	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>escV</i>	<i>bfp</i>	<i>est II</i>	<i>est Ia</i>	<i>junA</i>	<i>eltB</i>	<i>fedA</i>	<i>fasA</i>	<i>fueG</i>	<i>fimF41</i>	<i>stx2e</i>	<i>paa</i>	<i>aidA-I</i>	<i>sepA</i>
16470	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16471	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16472	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16473	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16474	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16475	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16478	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16481	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16482	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16483	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16484	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16487	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16488	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16489	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16491	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16492	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16493	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16494	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16495	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16496	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16497	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16498	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16501	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16502	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 27 Für extraintestinal-pathogene *E. coli* typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs): Adhäsion- und Eisenakquirierungsgene
 „0“ = negativ;
 „1“ = positiv.

IMT- Nummer	Adhäsingene										Eisenakquirierungsgene									
	<i>afa/dra</i>	<i>crl</i>	<i>fimC</i>	<i>hra</i>	<i>iha</i>	<i>mat</i>	<i>papC</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>tsh</i>	<i>chuA</i>	<i>feoB</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iroN</i>	<i>irp2</i>	<i>iucD</i>	<i>sitD chr.</i>	<i>sitD ep.</i>		
16412	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
13127	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16414	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
13122	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16415	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
13100	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
13109	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16416	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16417	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16418	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16419	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16420	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16421	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16422	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16423	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16424	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16425	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16426	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16427	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16428	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16429	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16430	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16431	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16432	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16433	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16434	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16435	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16436	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16437	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16438	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16439	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16440	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16441	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

IMT- Nummer	Adhäsingene										Eisenakquirierungene									
	<i>afa/dra</i>	<i>crl</i>	<i>fimC</i>	<i>hra</i>	<i>ihc</i>	<i>mat</i>	<i>papC</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>tsh</i>	<i>chuA</i>	<i>feoB</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iroN</i>	<i>irp2</i>	<i>iucD</i>	<i>sitD chr.</i>	<i>sitD ep.</i>		
16442	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
16443	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16444	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16445	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16446	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16447	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16448	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16449	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16450	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16451	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16452	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16453	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16454	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16455	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16456	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16457	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
16458	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16459	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
16460	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
14232	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0		
14233	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
14234	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
14227	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
14228	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
14229	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
14230	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
14231	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16461	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
16462	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
16463	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0		
16464	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
16465	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16466	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
16467	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
16468	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16469	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16470	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		

IMT- Nummer	Adhäsingene										Eisenakquirierungene									
	<i>afa/dra</i>	<i>crl</i>	<i>fimC</i>	<i>hra</i>	<i>ihc</i>	<i>mat</i>	<i>papC</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>tsh</i>	<i>chuA</i>	<i>feoB</i>	<i>fyuA</i>	<i>ireA</i>	<i>iroN</i>	<i>irp2</i>	<i>iucD</i>	<i>sitD chr.</i>	<i>sitD ep.</i>		
16471	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16472	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
16473	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16474	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0		
16475	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1		
16476	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
16477	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16478	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0		
16479	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16480	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0		
16481	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0		
16482	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16483	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16484	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16485	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16486	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16487	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16488	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16489	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16490	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0		
16491	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16492	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16493	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16494	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16495	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16496	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16497	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16498	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16499	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16500	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16501	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
16502	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Tab. 28 Für extraintestinal-pathogene *E. coli* typische, virulenzassoziierte Gene (VAGs): Gene für Serumresistenz, Toxine und Invasine
 „0“ = negativ;
 „1“ = positiv.

IMT-Nummer	Serumresistenzgene			Toxingene			Invasionsgene			Sonstige						
	<i>cv/cva</i>	<i>iss</i>	<i>kpsMTII</i>	<i>neuC</i>	<i>ompA</i>	<i>traT</i>	<i>astA</i>	<i>cnf1/2</i>	<i>hlyA</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>gimB</i>	<i>ibeA</i>	<i>tia</i>	<i>malX</i>	<i>pic</i>
16412	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13127	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16414	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13122	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16415	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13100	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13109	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16416	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16417	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16418	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16419	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
16420	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
16421	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
16422	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
16423	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16424	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1
16425	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
16426	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16427	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
16428	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
16429	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16430	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
16431	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16432	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16433	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16434	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
16435	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16436	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16437	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16438	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16439	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16440	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16441	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

IMT-Nummer	Serumresistenzgene					Toxingene					Invasionsgene			Sonstige		
	<i>cvi/cva</i>	<i>iss</i>	<i>kpsMTH</i>	<i>neuC</i>	<i>ompA</i>	<i>traT</i>	<i>astA</i>	<i>cnf1/2</i>	<i>hlyA</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>gimB</i>	<i>ibeA</i>	<i>tia</i>	<i>malX</i>	<i>pic</i>
16442	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16443	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16444	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16445	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16446	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16447	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16448	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16449	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16450	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16451	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16452	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16453	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16454	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16455	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16456	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16457	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16458	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16459	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16460	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14232	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
14233	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14234	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
14227	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14228	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14229	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14230	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14231	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16461	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16462	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
16463	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
16464	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
16465	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16466	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16467	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16468	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16469	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16470	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

IMT-Nummer	Serumresistenzgene					Toxingene					Invasionsgene			Sonstige		
	<i>cvi/cva</i>	<i>iss</i>	<i>kpsMTH</i>	<i>neuC</i>	<i>ompA</i>	<i>traT</i>	<i>astA</i>	<i>cnf1/2</i>	<i>hlyA</i>	<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>gimB</i>	<i>ibeA</i>	<i>tia</i>	<i>malX</i>	<i>pic</i>
16471	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16472	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16473	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16474	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
16475	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16476	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16477	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16478	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16479	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16480	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
16481	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16482	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16483	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16484	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16485	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16486	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16487	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16488	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16489	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16490	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
16491	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16492	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16493	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16494	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16495	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16496	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16497	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16498	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16499	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16500	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16501	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16502	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 29 Ergebnisse der Kohlenhydratverwertung von 35 Wildschwein-*E. coli*, die zufällig aus den untersuchten 102 *E. coli* ausgewählt wurden
 Spalten 1-49: 49 getestete Substrate, vgl. Tab. 9;
 Dunkelgrau unterlegt: positiv; hellgrau unterlegt: variabel; weiß unterlegt: negativ.

IMT-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49									
13109																																																										
14227																																																										
14229																																																										
14230																																																										
14231																																																										
14232																																																										
14234																																																										
16414																																																										
16417																																																										
16420																																																										
16425																																																										
16459																																																										
16461																																																										
16463																																																										
16465																																																										
16467																																																										
16468																																																										
16470																																																										
16471																																																										
16473																																																										
16474																																																										
16477																																																										
16480																																																										
16481																																																										
16482																																																										
16483																																																										
16484																																																										
16485																																																										
16486																																																										
16490																																																										
16493																																																										
16495																																																										
16500																																																										
16501																																																										
16502																																																										

Zitierte Literatur

1. **Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., und Dewhirst, F. E.** (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **43**:5721-32.
2. **Abrams, G. D.** (1983). Impact of the intestinal microflora on intestinal structure and function, S. 292-310. In D. J. Hentges (Hrsg.), Human Intestinal microflora in health and disease. Academic Press: New York.
3. **Allaby, M.** (1998). A dictionary of ecology, 2. Ausgabe. Oxford Univ. Press: Oxford, NY.
4. **Allen, K. P., Randolph, M. M., und Fleckenstein, J. M.** (2006). Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **74**:869-75.
5. **Andrup, L., und Andersen, K.** (1999). A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from *Escherichia coli* and plasmid pCF10 from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* **145** (Pt 8):2001-9.
6. **Anguita, M., Canibe, N., Perez, J. F., und Jensen, B. B.** (2006). Influence of the amount of dietary fiber on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: use of cannulated pigs and *in vitro* fermentation. *J Anim Sci* **84**:2766-78.
7. **Autenrieth, I.** (2000). Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *Journal für Ernährungsmedizin* **2**.
8. **Bäckhed, F., Alsen, B., Roche, N., Angstrom, J., von Euler, A., Breimer, M. E., Westerlund-Wikstrom, B., Teneberg, S., und Richter-Dahlfors, A.** (2002). Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem* **277**:18198-205.
9. **Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., und Gordon, J. I.** (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**:1915-20.
10. **Bao, W. B., Wu, S. L., Musa, H. H., Zhu, G. Q., und Chen, G. H.** (2008). Genetic variation at the alpha-1-fucosyltransferase (FUT1) gene in Asian wild boar and Chinese and Western commercial pig breeds. *J Anim Breed Genet* **125**:427-30.
11. **Barbara, G., Stanghellini, V., Brandi, G., Cremon, C., Di Nardo, G., De Giorgio, R., und Corinaldesi, R.** (2005). Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *Am J Gastroenterol* **100**:2560-8.
12. **Barth, S., Tscholshiew, A., Menge, C., Weiss, R., Baljer, G., und Bauerfeind, R.** (2007). Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **120**:307-16.
13. **Bary, A.** (1879). Die Erscheinung der Symbiose, Vortrag, geh. v. A. de Bary. Trübner: Straßburg.
14. **Bauernfeind, A.** (1990). Lexikon der Mikrobiologie und der Infektiologie mit einem tabellarischen Anhang. Schattauer: Stuttgart.

15. **Becker, U., und Arnheim, K.** Herder-Lexikon der Biologie. Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg; Berlin [u.a.].
16. **Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P. J., und Parsot, C.** (1995). *SepA*, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* **17**:123-35.
17. **Berg, R. D.** (1995). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* **3**:149-54.
18. **Berg, R. D.** (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* **4**:430-5.
19. **Bergthorsson, U., und Ochman, H.** (1995). Heterogeneity of genome sizes among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:5784-9.
20. **Bettelheim, K. A., Goldwater, P. N., Evangelidis, H., Pearce, J. L., und Smith, D. L.** (1992). Distribution of toxigenic *Escherichia coli* serotypes in the intestines of infants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **15**:65-70.
21. **Bezirtzoglou, E.** (1997). The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe* **3**:173-7.
22. **Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M. J., und Relman, D. A.** (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:732-7.
23. **Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., und Denamur, E.** (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* **177**:642-50.
24. **Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N., Loukil, C., Barraud, D., und Bingen, E.** (2002). Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* **70**:3216-26.
25. **Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., und Blanco, J.** (1998). Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* *CNF1+* and *CNF2+* in healthy cattle. *Res Microbiol* **149**:47-53.
26. **Blaut, M.** (2006). Ökologie des Darmes, S. 46-55. In W. Caspary (Hrsg.), *Infektiologie des Gastrointestinaltraktes*. Springer-Medizin-Verlag: Heidelberg.
27. **Blaut, M., und Clavel, T.** (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* **137**:751S-5S.
28. **Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C. L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S. A., Friendship, R., und Archambault, M.** (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol* **71**:6753-61.

29. **Bohnhoff, M., Miller, C. P., und Martin, W. R.** (1964). Resistance of the Mouse's Intestinal Tract to Experimental Salmonella Infection. Ii. Factors Responsible for Its Loss Following Streptomycin Treatment. *J Exp Med* **120**:817-28.
30. **Bökönyi, S., Braidwood, R. J., und Reed, C. A.** (1973). Earliest Animal Domestication Dated? *Science* **182**:1161.
31. **Bonacorsi, S., Clermont, O., Houdouin, V., Cordevant, C., Brahimi, N., Marecat, A., Tinsley, C., Nassif, X., Lange, M., und Bingen, E.** (2003). Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *J Infect Dis* **187**:1895-906.
32. **Boucher, D. H.** (1985). The biology of mutualism ecology and evolution. Croom Helm: London [u.a.].
33. **Boyd, E. F., und Hartl, D. L.** (1998). Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol* **180**:1159-65.
34. **Braun, J.** (1997). Biologie heute entdecken S II, Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern Ausgabe. Schroedel: Braunschweig.
35. **Bry, L., Falk, P. G., Midtvedt, T., und Gordon, J. I.** (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* **273**:1380-3.
36. **Buchner, P.** (1953). Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. Birkhaeuser: Stuttgart.
37. **Bull, A., und Slater, J.** (1982). Microbial interactions and communities. Academ. Pr.: London.
38. **Casey, T. A., und Bosworth, B. T.** (2009). Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *J Vet Diagn Invest* **21**:25-30.
39. **Castagliuolo, I., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T., und Pothoulakis, C.** (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* **67**:302-7.
40. **Cebra, J. J.** (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* **69**:1046S-1051S.
41. **Chapman, T. A., Wu, X. Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., und Chin, J. J.** (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* **72**:4782-95.
42. **Choi, C., Kwon, D., und Chae, C.** (2001). Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets. *J Vet Diagn Invest* **13**:26-9.

43. **Chowdhury, S. R., King, D. E., Willing, B. P., Band, M. R., Beever, J. E., Lane, A. B., Loor, J. J., Marini, J. C., Rund, L. A., Schook, L. B., Van Kessel, A. G., and Gaskins, H. R.** (2007). Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genomics* **8**:215.
44. **Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E.** (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**:4555-8.
45. **Collis, C. M., and Hall, R. M.** (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:155-62.
46. **Cong, Y., Brandwein, S. L., McCabe, R. P., Lazenby, A., Birkenmeier, E. H., Sundberg, J. P., and Elson, C. O.** (1998). CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* **187**:855-64.
47. **Day, R. L., Laland, K. N., and Odling-Smee, F. J.** (2003). Rethinking adaptation: the niche-construction perspective. *Perspect Biol Med* **46**:80-95.
48. **Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., and Relman, D. A.** (2006). Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* **21**:517-23.
49. **Diamant, E., Palti, Y., Gur-Arie, R., Cohen, H., Hallerman, E. M., and Kashi, Y.** (2004). Phylogeny and strain typing of *Escherichia coli*, inferred from variation at mononucleotide repeat loci. *Appl Environ Microbiol* **70**:2464-73.
50. **Dixit, S. M., Gordon, D. M., Wu, X. Y., Chapman, T., Kailasapathy, K., and Chin, J. J.** (2004). Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* - associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract. *Microbiology* **150**:1735-40.
51. **Donnenberg, M. S., and Whittam, T. S.** (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107**:539-48.
52. **Drasar, B. S.** (1974). Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **3**:187-96.
53. **Dubos, R., Schaedler, R. W., Costello, R., and Hoet, P.** (1965). Indigenous, Normal and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med* **122**:67-76.
54. **Dulguer, M. V., Fabbricotti, S. H., Bando, S. Y., Moreira-Filho, C. A., Fagundes-Neto, U., and Scaletsky, I. C.** (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**:1685-94.
55. **Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventre, A., Elion, J., Picard, B., and Denamur, E.** (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* **147**:1671-6.

56. **Duriez, P., Zhang, Y., Lu, Z., Scott, A., und Topp, E.** (2008). Loss of virulence genes in *Escherichia coli* populations during manure storage on a commercial swine farm. *Appl Environ Microbiol* **74**:3935-42.
57. **Durso, L. M., Smith, D., und Hutkins, R. W.** (2004). Measurements of fitness and competition in commensal *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains. *Appl Environ Microbiol* **70**:6466-72.
58. **Elton, C. S.** (1958). The Ecology of invasions by animals and plants. Methuen: London.
59. **Epstein, S. S.** (2003). Microbial interactions. *Encyclopedia of life science*.
60. **Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguenec, C., und Denamur, E.** (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **21**:1085-94.
61. **Escobar-Paramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M. C., Andremont, A., Denamur, E., und Ruimy, R.** (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**:5698-700.
62. **Escobar-Paramo, P., Le Menach, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Skurnik, D., und Denamur, E.** (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* **8**:1975-84.
63. **Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E. M., Laturus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Philipp, H. C., und Wieler, L. H.** (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* **297**:163-76.
64. **Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T., und Gordon, J. I.** (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1157-70.
65. **Finegold, G. R., Sutter, V. L., und E., M. G.** (1983). Normal indigenous flora, S. 3-31. In D. J. Hentges (Hrsg.), Human intestinal flora in health and disease. N.Y.: Academic Press: New York.
66. **Fox, J. T., Drouillard, J. S., Shi, X., und Nagaraja, T. G.** (2009). Effects of mucin and its carbohydrate constituents on *Escherichia coli* O157 growth in batch culture fermentations with ruminal or fecal microbial inoculum. *J Anim Sci* **87**:1304-13.
67. **Franklin, M. A., Mathew, A. G., Vickers, J. R., und Clift, R. A.** (2002). Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *J Anim Sci* **80**:2904-10.
68. **Freter, R.** (1983). Mechanisms That Control the Microflora in the Large Intestine, S. 33-45. In D. J. Hentges (Hrsg.), Human intestinal microflora in health and disease. Academic Press: New York.

69. **Frydendahl, K.** (2002). Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* **85**:169-82.
70. **Fuller, R.** (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**:365-78.
71. **Germon, P., Chen, Y. H., He, L., Blanco, J. E., Bree, A., Schouler, C., Huang, S. H., und Moulin-Schouleur, M.** (2005). *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **151**:1179-86.
72. **Giuffra, E., Kijas, J. M., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon, J. T., und Andersson, L.** (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* **154**:1785-91.
73. **Gorbach, S. L., und Goldin, B. R.** (1990). The intestinal microflora and the colon cancer connection. *Rev Infect Dis* **12 Suppl 2**:S252-61.
74. **Gordon, D. M., und FitzGibbon, F.** (1999). The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. *Microbiology* **145 (Pt 10)**:2663-71.
75. **Gordon, D. M., und Lee, J.** (1999). The genetic structure of enteric bacteria from Australian mammals. *Microbiology* **145 (Pt 10)**:2673-82.
76. **Gordon, D. M., und Cowling, A.** (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* **149**:3575-86.
77. **Gordon, D. M.** (2004). The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*, S. XIII, 806 S. : graph. Darst. In F. Neidhardt (Hrsg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Soc. for Microbiology: Washington, D. C.
78. **Gordon, D. M., Stern, S. E., und Collignon, P. J.** (2005). Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology* **151**:15-23.
79. **Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., und Denamur, E.** (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* **10**:2484-96.
80. **Gordon, H. A., und Bruckner-Kardoss, E.** (1961). Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. *Am J Physiol* **201**:175-8.
81. **Görtz, H. D.** (1988). Formen des Zusammenlebens Symbiose, Parasitismus und andere Vergesellschaftungen von Tieren. Wiss. Buchges.: Darmstadt.
82. **Hacker, J., und Kaper, J. B.** (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**:641-79.
83. **Hahn, H.** (2009). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie mit 157 Tabellen, 6., komplett überarb. Aufl. Ausgabe. Springer: Heidelberg.
84. **Hartel, P. G., Summer, J. D., und Segars, W. I.** (2003). Deer diet affects ribotype diversity of *Escherichia coli* for bacterial source tracking. *Water Res* **37**:3263-8.

85. **Hartl, D. L., und Dykhuizen, D. E.** (1984). The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **18**:31-68.
86. **Hartley, C. L., Neumann, C. S., und Richmond, M. H.** (1979). Adhesion of commensal bacteria to the large intestine wall in humans. *Infect Immun* **23**:128-32.
87. **Hayashi, H., Sakamoto, M., und Benno, Y.** (2002). Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* **46**:535-48.
88. **Hill, M. J.** (1979). Role of bacteria in human carcinogenesis. *J Hum Nutr* **33**:416-26.
89. **Hinton, M., Hampson, D. J., Hampson, E., und Linton, A. H.** (1985). A comparison of the ecology of *Escherichia coli* in the intestine of healthy unweaned pigs and pigs after weaning. *J Appl Bacteriol* **58**:471-7.
90. **Holler, S., Schäfers, C., und Sonnenberg, J.** (1996). Umweltanalytik und Ökotoxikologie mit 34 Tabellen. Springer: Berlin [u.a.].
91. **Hooper, L. V., Xu, J., Falk, P. G., Midtvedt, T., und Gordon, J. I.** (1999). A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9833-8.
92. **Hooper, L. V., Falk, P. G., und Gordon, J. I.** (2000). Analyzing the molecular foundations of commensalism in the mouse intestine. *Curr Opin Microbiol* **3**:79-85.
93. **Hooper, L. V., Midtvedt, T., und Gordon, J. I.** (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* **22**:283-307.
94. **Hugenholtz, P., Goebel, B. M., und Pace, N. R.** (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**:4765-74.
95. **Hunter, P. R., und Gaston, M. A.** (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **26**:2465-6.
96. **Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N., und Ushida, K.** (2005). Development of the intestinal microbiota in the piglet. *J Gen Appl Microbiol* **51**:257-65.
97. **Jadamus, A., Vahjen, W., Schafer, K., und Simon, O.** (2002). Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **86**:42-54.
98. **Jallat, C., Livrelli, V., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C., und Joly, B.** (1993). *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J Clin Microbiol* **31**:2031-7.
99. **Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C., und Joly, B.** (1994). Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol* **145**:621-32.

100. **Johnson, A. M., Kaushik, R. S., Francis, D. H., Fleckenstein, J. M., and Hardwidge, P. R.** (2009). Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacteriol* **191**:178-86.
101. **Johnson, J. R., and Kuskowski, M.** (2000). Clonal origin, virulence factors, and virulence. *Infect Immun* **68**:424-5.
102. **Johnson, J. R., Delavari, P., Stell, A. L., Whittam, T. S., Carlino, U., and Russo, T. A.** (2001). Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *J Infect Dis* **183**:154-9.
103. **Johnson, J. R., and Russo, T. A.** (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J Lab Clin Med* **139**:155-62.
104. **Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A., and Winokur, P. L.** (2003). Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis* **188**:759-68.
105. **Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., Mobley, H. L., and Tarr, P. I.** (2005). The *IrgA* homologue adhesin *Iha* is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* **73**:965-71.
106. **Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J. P., Jimenez de Anta, M. T., and Vila, J.** (2005). Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis* **191**:46-50.
107. **Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., and Nolan, L. K.** (2008). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **74**:2360-9.
108. **Kaper, J. B., Nataro, J. P., and Mobley, H. L.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-40.
109. **Katouli, M., Lund, A., Wallgren, P., Kuhn, I., Soderlind, O., and Mollby, R.** (1995). Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods. *Appl Environ Microbiol* **61**:778-83.
110. **Kayser, F. H.** (1998). Medizinische Mikrobiologie, 9., überarb. und neugest. Aufl. Ausgabe. Thieme: Stuttgart ; New York.
111. **Kleta, S., Steinruck, H., Breves, G., Duncker, S., Laturnus, C., Wieler, L. H., and Schierack, P.** (2006). Detection and distribution of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in Germany. *J Appl Microbiol* **101**:1357-66.
112. **Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., Akkermans, A. D., Smidt, H., and de Vos, W. M.** (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ Microbiol* **8**:1191-9.
113. **Kratochwil, A., and Schwabe, A.** (2001). Ökologie der Lebensgemeinschaften. Ulmer: Stuttgart.

114. **Lalles, J. P., Bosi, P., Smidt, H., and Stokes, C. R.** (2007). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc Nutr Soc* **66**:260-8.
115. **Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T., Willerslev, E., Rowley-Conwy, P., Andersson, L., and Cooper, A.** (2005). Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* **307**:1618-21.
116. **Law, D., and Chart, H.** (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **84**:685-97.
117. **Lawrence, J. G., and Ochman, H.** (1997). Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol* **44**:383-97.
118. **Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., and Tenaillon, O.** (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol* **24**:2373-84.
119. **Leclerc, S., Boerlin, P., Gyles, C., Dubreuil, J. D., Mourez, M., Fairbrother, J. M., and Harel, J.** (2007). *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res Microbiol* **158**:97-104.
120. **Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., and Denamur, E.** (1998). *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol* **15**:1685-95.
121. **Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., and Moller, K.** (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* **68**:673-90.
122. **Leung, T., and Poulin, R.** (2008). Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et milieu - life and environment* **58**:107-115.
123. **Leveille, S., Caza, M., Johnson, J. R., Clabots, C., Sabri, M., and Dozois, C. M.** (2006). *Iha* from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed *in vivo* in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect Immun* **74**:3427-36.
124. **Li, G., Laturus, C., Ewers, C., and Wieler, L. H.** (2005). Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **73**:2818-27.
125. **Lidin-Janson, G., Kaijser, B., Lincoln, K., Olling, S., and Wedel, H.** (1978). The homogeneity of the faecal coliform flora of normal school-girls, characterized by serological and biochemical properties. *Med Microbiol Immunol* **164**:247-53.
126. **Liesegang, A., and Tschape, H.** (2002). Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol* **291**:645-8.

127. **Lobley, C., Schmitzberger, F., Kilkenny, M., Whitney, H., Ottenhof, H., Chakauya, E., Webb, M., Birch, L., Tuck, K., Abell, C., Smith, A., und Blundell, T.** (2003). Structural insights into the evolution of the pantothenate-biosynthesis pathway. *Biochem Soc Trans* **3**:563-71.
128. **Lynch, J. M.** (1979). *Microbial ecology a conceptual approach*. Blackwell: Oxford [u.a.].
129. **Macha, M., Taras, D., Vahjen, W., Arini, A., und Simon, O.** (2004). Specific enumeration of the probiotic strain *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in the intestinal tract and in faeces of piglets and sows. *Arch Anim Nutr* **58**:443-52.
130. **Mackie, R. I., Sghir, A., und Gaskins, H. R.** (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* **69**:1035S-1045S.
131. **Macpherson, A. J., Geuking, M. B., und McCoy, K. D.** (2005). Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology* **115**:153-62.
132. **Madigan, M. T., Martinko, J. M., und Brock, T. D.** (2006). *Brock Mikrobiologie, Brock biology of microorganisms dt., 11., überarb. Aufl. Ausgabe*. Pearson Studium: München [u.a.].
133. **Martin, K.** (2002). *Ökologie der Biozönosen*. Springer: Berlin [u.a.].
134. **Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., und Kasper, D. L.** (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* **122**:107-18.
135. **Megee, R., Drake, J., Fredrickson, A., und HM, T.** (1972). Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Canadian journal of microbiology* **18 (11)**:1733-42.
136. **Merlino, J., Siarakas, S., Robertson, G. J., Funnell, G. R., Gottlieb, T., und Bradbury, R.** (1996). Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* **34**:1788-93.
137. **Miranda, R. L., Conway, T., Leatham, M. P., Chang, D. E., Norris, W. E., Allen, J. H., Stevenson, S. J., Laux, D. C., und Cohen, P. S.** (2004). Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infect Immun* **72**:1666-76.
138. **Miura, Y., Tanaka, H., und Okazaki, M.** (1979). Stability analysis of commensal and mutual relations with competitive assimilation in continuous mixed culture. *Biotechnol Bioeng* **22**:929-946.
139. **Molles, M. C.** (2006). *Ecology concepts and applications, 4. Ausgabe*. McGraw-Hill: Boston, Mass. [u.a.].
140. **Moon, H. W., Hoffman, L. J., Cornick, N. A., Booher, S. L., und Bosworth, B. T.** (1999). Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa. *J Vet Diagn Invest* **11**:557-60.

141. **Moulin-Schouleur, M., Reperant, M., Laurent, S., Bree, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., und Schouler, C.** (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* **45**:3366-76.
142. **Mountzouris, K. C., Balaskas, C., Fava, F., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., und Fegeros, K.** (2006). Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. *Anaerobe* **12**:178-85.
143. **Moxley, R. A., Berberov, E. M., Francis, D. H., Xing, J., Moayeri, M., Welch, R. A., Baker, D. R., und Barletta, R. G.** (1998). Pathogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* hemolysin (*hlyA*) mutant in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **66**:5031-5.
144. **Moya, A., Pereto, J., Gil, R., und Latorre, A.** (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Genet* **9**:218-29.
145. **Müller, D., Hagedorn, P., Brast, S., Heusipp, G., Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Karch, H., und Schmidt, M. A.** (2006). Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* **44**:2626-9.
146. **Muniesa, M., Recktenwald, J., Bielaszewska, M., Karch, H., und Schmidt, H.** (2000). Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun* **68**:4850-5.
147. **Nakanishi, N., Abe, H., Ogura, Y., Hayashi, T., Tashiro, K., Kuhara, S., Sugimoto, N., und Tobe, T.** (2006). ppGpp with *DksA* controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. *Mol Microbiol* **61**:194-205.
148. **Nataro, J. P., und Kaper, J. B.** (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
149. **Nentwig, W.** (2004). Ökologie, 1. Aufl. Ausgabe. Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg.
150. **Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D. M., und Fairbrother, J. M.** (2003). Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
151. **Niewerth, U., Frey, A., Voss, T., Le Bouguenec, C., Baljer, G., Franke, S., und Schmidt, M. A.** (2001). The AIDA autotransporter system is associated with *F18* and *stx2e* in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
152. **Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., Aberg, N., Wold, A. E., und Adlerberth, I.** (2003). *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res* **54**:8-14.

153. **Nowrouzian, F. L., Adlerberth, I., and Wold, A. E.** (2006). Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect* **8**:834-40.
154. **O'Hara, A. M., O'Regan, P., Fanning, A., O'Mahony, C., Macsharry, J., Lyons, A., Bienenstock, J., O'Mahony, L., and Shanahan, F.** (2006). Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* **118**:202-15.
155. **O'Hara, A. M., and Shanahan, F.** (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* **7**:688-93.
156. **Osek, J.** (1999). Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet Microbiol* **68**:209-17.
157. **Osek, J.** (2003). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (*EAST1*) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. *Vet Microbiol* **91**:65-72.
158. **Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A., and Dewhirst, F. E.** (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **183**:3770-83.
159. **Peterson, W. H., and Peterson, M. S.** (1945). Relation of Bacteria to Vitamins and Other Growth Factors. *Bacteriol Rev* **9**:49-109.
160. **Picard, B., and Goulet, P.** (1989). Correlation between electrophoretic types B1 and B2 of carboxylesterase B and sex of patients in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Epidemiol Infect* **103**:97-103.
161. **Picard, B., Journet-Mancy, C., Picard-Pasquier, N., and Goulet, P.** (1993). Genetic structures of the B2 and B1 *Escherichia coli* strains responsible for extra-intestinal infections. *J Gen Microbiol* **139**:3079-88.
162. **Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., and Denamur, E.** (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* **67**:546-53.
163. **Pieper, R.** (2008). Evaluation of strategies to influence the developing microbiota in the gastrointestinal tract of weaning piglets. Mensch & Buch: Berlin.
164. **Pierpoint, W. S., Hughes, D. E., Baddiley, J., and Mathias, A. P.** (1955). The effect of some pantothenate derivatives on growth and coenzyme-A synthesis in bacteria. *Biochem J* **61**:190-7.
165. **Pizarro-Cerda, J., and Tedin, K.** (2004). The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol* **52**:1827-44.
166. **Pluske, J. R.** (2003). Weaning the pig, concepts and consequences. Wageningen Acad. Publ.: Wageningen.
167. **Pouttu, R., Westerlund-Wikstrom, B., Lang, H., Alsti, K., Virkola, R., Saarela, U., Siitonen, A., Kalkkinen, N., and Korhonen, T. K.** (2001). *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J Bacteriol* **183**:4727-36.

168. **Reilly, P. J.** (1974). Stability of commensalistic systems. *Biotechnol Bioeng* **16**:1373-92.
169. **Robinson, I. M., Whipp, S. C., Bucklin, J. A., and Allison, M. J.** (1984). Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl Environ Microbiol* **48**:964-9.
170. **Russo, T. A., and Johnson, J. R.** (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **181**:1753-4.
171. **Russo, T. A., Carlino, U. B., and Johnson, J. R.** (2001). Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**:6209-16.
172. **Ruvinsky, A., and Rothschild, M.** (1998). Systematics and evolution of the pig, S. 1-16. In M. F. R. A. Ruvinsky (Hrsg.), *The Genetics of the Pig*. CAB International: Oxon, UK.
173. **Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., and Mattila-Sandholm, T.** (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* **84**:197-215.
174. **Salanitro, J. P., Blake, I. G., and Muirhead, P. A.** (1977). Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Appl Environ Microbiol* **33**:79-84.
175. **Sansom, B. F., and Gleed, P. T.** (1981). The ingestion of sow's faeces by suckling piglets. *Br J Nutr* **46**:451-6.
176. **Savage, D. C.** (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**:107-33.
177. **Savage, D. C., Siegel, J. E., Snellen, J. E., and Whitt, D. D.** (1981). Transit time of epithelial cells in the small intestines of germfree mice and ex-germfree mice associated with indigenous microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **42**:996-1001.
178. **Savage, D. C.** (2001). Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. *Curr Issues Intest Microbiol* **2**:1-15.
179. **Savarino, S. J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B. M., Levine, M. M., Guandalini, S., and Guerry, P.** (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:3093-7.
180. **Schäfer, M., and Tischler, W.** (1983). *Ökologie*, 2., überarb. u. erw. Aufl. Ausgabe. Fischer: Stuttgart.
181. **Schaible, U. E., and Kaufmann, S. H.** (2004). Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**:946-53.
182. **Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K. D., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M. F., Wieler, L. H., and Tedin, K.** (2005). Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet Immunol Immunopathol* **105**:151-61.

183. **Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., and Wieler, L. H.** (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**:293-305.
184. **Schierack, P., Steinruck, H., Kleta, S., und Vahjen, W.** (2006). Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Appl Environ Microbiol* **72**:6680-6.
185. **Schierack, P., Walk, N., Reiter, K., Weyrauch, K. D., und Wieler, L. H.** (2007). Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* **153**:3830-7.
186. **Schierack, P., Walk, N., Ewers, C., Wilking, H., Steinruck, H., Filter, M., und Wieler, L. H.** (2008). ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Environ Microbiol* **10**:1742-51.
187. **Schlager, T. A., Hendley, J. O., Bell, A. L., und Whittam, T. S.** (2002). Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect Immun* **70**:1225-9.
188. **Seeliger, S., Janssen, P. H., und Schink, B.** (2002). Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol Lett* **211**:65-70.
189. **Selander, R. K., Caughant, D., und Whittam, T.** (1987). Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, S. 1625-1648. In F. C. Neidhardt (Hrsg.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology: Washington.
190. **Shanahan, F.** (2002). The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16**:915-31.
191. **Sheintuch** (1980). Dynamics of Commensalistic Systems with Self and Cross-Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* **XXII**:2557-2577.
192. **Shindala, A., Bungay, H. R., 3rd, Krieg, N. R., und Culbert, K.** (1965). Mixed-Culture Interactions. I. Commensalism of *Proteus Vulgaris* with *Saccharomyces Cerevisiae* in Continuous Culture. *J Bacteriol* **89**:693-6.
193. **Simon, G. L., und Gorbach, S. L.** (1984). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* **86**:174-93.
194. **Simon, O., Vahjen, W., und Taras, D.** (2004). Presented at the Hülseberger Gespräche "Mikrobiologie und Tierernährung", Lübeck, 9.-11.6.2004.
195. **Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Andremont, A., und Ruimy, R.** (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3062-5.

196. **Skurnik, D., Bonnet, D., Bernede-Bauduin, C., Michel, R., Guette, C., Becker, J. M., Balaire, C., Chau, F., Mohler, J., Jarlier, V., Boutin, J. P., Moreau, B., Guillemot, D., Denamur, E., Andremont, A., and Ruimy, R.** (2008). Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ Microbiol* **10**:2132-7.
197. **Smith, H. W.** (1965). Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition. *J Pathol Bacteriol* **89**:95-122.
198. **Smith, J. L., Fratamico, P. M., and Gunther, N. W.** (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* **4**:134-63.
199. **Souza, V., Rocha, M., Valera, A., and Eguiarte, L. E.** (1999). Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol* **65**:3373-85.
200. **Stephanopoulos, G.** (1981). The Dynamics of Commensalism. *Biotechnology and Bioengineering* **XXIII**:2243-2255.
201. **Stevens, C. E., and Hume, I. D.** (1998). Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol Rev* **78**:393-427.
202. **Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., and Dore, J.** (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**:4799-807.
203. **Tabaqchali, S., and Booth, C. C.** (1966). Jejunal bacteriology and bile-salt metabolism in patients with intestinal malabsorption. *Lancet* **2**:12-5.
204. **Tancrede, C.** (1992). Role of human microflora in health and disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**:1012-5.
205. **Tannock, G. W., Fuller, R., and Pedersen, K.** (1990). Lactobacillus succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl Environ Microbiol* **56**:1310-6.
206. **Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., and Simon, O.** (2006). Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J Anim Sci* **84**:608-17.
207. **Tischler, W.** (1993). Einführung in die Ökologie, 4., stark veränd. und erw. Aufl. Ausgabe. G. Fischer: Stuttgart; Jena; New York.

208. **Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J. M., Gilles, A. M., Johnson, J., Le Bouguenec, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jehanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M. A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C. S., Schneider, D., Tourret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Medigue, C., Rocha, E. P., und Denamur, E.** (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* **5**:e1000344.
209. **Troeger, H., Richter, J. F., Beutin, L., Gunzel, D., Dobrindt, U., Epple, H. J., Gitter, A. H., Zeitz, M., Fromm, M., und Schulzke, J. D.** (2007). *Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. *Cell Microbiol* **9**:2530-40.
210. **Valen, L. V.** (1965). Morphological Variation and Width of Ecological Niche. *The American Naturalist* **99**:377.
211. **Van Beneden, P. J.** (1876). Die Schmarotzer des Thierreichs dt., Autoris. Ausg. Ausgabe. Brockhaus: Leipzig.
212. **Wadolowski, E. A., Laux, D. C., und Cohen, P. S.** (1988). Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain: role of growth in mucus. *Infect Immun* **56**:1030-5.
213. **Walk, S. T., Alm, E. W., Calhoun, L. M., Mladonicky, J. M., und Whittam, T. S.** (2007). Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol* **9**:2274-88.
214. **Wang, Y.** (2002). The function of *OmpA* in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **292**:396-401.
215. **Wannamaker, L. W.** (1980). Bacterial interference and competition. *Scand J Infect Dis Suppl Suppl* **24**:82-5.
216. **Wiesner, E.** (2000). Lexikon der Veterinärmedizin, 4., völlig neu bearb. Aufl. Ausgabe. Enke: Stuttgart.
217. **Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C., Ochman, H., und Achtman, M.** (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**:1136-51.
218. **Wittig, R., und Streit, B.** (2004). Ökologie 52 Tabellen. Ulmer: Stuttgart.
219. **Wolin, M. J., und Miller, T. L.** (1983). Carbohydrate fermentation, S. 147–165. In H. D.A. (Hrsg.), Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Academic Press: New York.
220. **Wu, X. Y., Chapman, T., Trott, D. J., Bettelheim, K., Do, T. N., Driesen, S., Walker, M. J., und Chin, J.** (2007). Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. *Appl Environ Microbiol* **73**:83-91.

221. **Yamamoto, T., and Echeverria, P.** (1996). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* **64**:1441-5.
222. **Yamamoto, T., Wakisaka, N., Nakae, T., Kamano, T., Serichantalergs, O., and Echeverria, P.** (1996). Characterization of a novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristics of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. *Infect Immun* **64**:3694-702.
223. **Zhang, L., Foxman, B., and Marrs, C.** (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol* **40**:3951-5.
224. **Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., and Francis, D.** (2007). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**:145-52.
225. **Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., and De Vos, W. M.** (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**:3854-9.
226. **Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I., and Gaskins, H. R.** (2004). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* **134**:465-72.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit konnte nur unter Mithilfe vieler verschiedener Personen entstehen.

Zunächst danke ich daher Prof. Dr. Lothar H. Wieler für die Überlassung des Themas, für die gute fachliche Betreuung und für die vielen konstruktiven Hinweise.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der NaFöG-Promotionsförderung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Peter Schierack bedanken. Vielen Dank, Peter, für die umfangreichen Vorarbeiten zu dem Thema, insbesondere für die Bereitstellung zahlreicher Wildschwein-*E. coli*, für die hervorragende Betreuung im Labor, für die Hilfestellungen bei der Auswertung der Daten – auch aus der Ferne – und vor allem für die freundschaftliche und herzliche Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin sei für die konstruktive Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre gedankt.

Namentlich danke ich Dr. Karsten Tedin für die Aufnahme in seine „Salmonellen-Arbeitsgruppe“ und seine beständige Bereitschaft, meine Fragen ausführlich und erschöpfend zu beantworten.

Bei Dr. Christa Ewers bedanke ich mich für die vielen Ratschläge und Anregungen. Mit ihrem ausgezeichneten Fachwissen konnte sie mir häufig weiterhelfen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Peter Schwerk für seine unverzichtbare Hilfe im Labor und bei IT-Problemen.

Natürlich danke ich auch allen Jägern, Förstern, Tierärzten und Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung und der Klinik für Klauentiere der FU Berlin, die mich beim Sammeln der Kotproben von Wild- und Hausschweinen unterstützt haben.

Ebenso bedanke ich mich bei Anja Lüdecke und Matthias Filter für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Weiterhin danke ich Claudia, Katrin, Sylvia, Alex, Britta, Nicole, Angela und Corinna. Ihr wart und seid ein wichtiger und motivierender Rückhalt.

Insbesondere danke ich auch meinen Eltern und meinem Bruder Paul für das Vertrauen in meine Fähigkeiten und die stete Unterstützung.

Meinem Freund Max danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und für die Hilfe beim Formatieren der Arbeit; hauptsächlich jedoch für seine Geduld und für seine Zuversicht.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen zu haben.

Berlin, den 10.08.2009

.....
(Antje Römer)