

Aus dem
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven

**Molekulare epidemiologische Untersuchungen aviärer pathogener
Escherichia coli (APEC) – Wildtypstämme und Etablierung einer
diagnostischen Multiplex-PCR**

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

vorgelegt von
Traute Janßen
Tierärztin aus Ihlow

Berlin 2002

Journal Nr. 2672

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. H. Wieler

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Ludwig

Tag der Promotion: 17. Dezember 2002

Für Lina

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Schrifttum | 3 |
| 2.1 | Kolibazillose | 3 |
| 2.1.1 | Einführung | 3 |
| 2.1.2 | Ätiologie | 4 |
| 2.1.3 | Epidemiologie | 4 |
| 2.1.4 | Virulenzfaktoren | 5 |
| 2.1.4.1 | Fimbrien | 7 |
| 2.1.4.2 | Aerobactin | 12 |
| 2.1.4.3 | Hämolyisin | 15 |
| 2.1.4.4 | Temperatur-sensitives Hämagglutinin | 16 |
| 2.1.4.5 | Anti- Wirtsabwehrsysteme | 18 |
| 2.1.4.6 | Toxine und Cytotoxine | 25 |
| 2.1.5 | Pathogenese | 26 |
| 2.1.5.1 | Pathogenesemodell | 27 |
| 3 | Material und Methoden | 30 |
| 3.1 | Material | 30 |
| 3.1.1 | Verwendete Bakterienstämme | 30 |
| 3.1.2 | Geräte | 31 |
| 3.1.3 | Chemikalien, Nährmedien und Lösungen | 32 |
| 3.1.3.1 | Chemikalien | 32 |
| 3.1.3.2 | Nährmedien | 33 |
| 3.1.3.3 | Lösungen | 34 |
| 3.1.4 | Oligonukleotid-Primer und DNS-Sonden | 38 |
| 3.1.4.1 | Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation | 38 |
| 3.1.4.2 | Oligonukleotid-Sonden für die DNS-DNS-Hybridisierung | 40 |
| 3.2 | Methoden | 41 |
| 3.2.1 | Anzucht und Stammhaltung der Bakterien | 41 |
| 3.2.2 | DNS-Isolierung | 41 |
| 3.2.3 | Serotypisierung | 41 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 42 |
| 3.2.5 | Agarose-Gelelektrophorese | 44 |
| 3.2.6 | Contour-clamped homogenous electric field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF – PFGE) | 45 |
| 3.2.7 | DNS-DNS-Hybridisierung | 46 |
| 3.2.7.1 | Dot-Blot | 46 |
| 3.2.7.2 | Sondenherstellung mittels PCR | 47 |
| 3.2.7.3 | Hybridisierungsvorgang und Visualisierung | 47 |
| 4 | Ergebnisse | 48 |
| 4.1 | Charakterisierung der aviären pathogenen <i>E. coli</i> -Feldstämme | 48 |
| 4.1.1 | Biotypisierung | 48 |
| 4.1.2 | Serotypisierung | 48 |
| 4.1.3 | Molekularbiologische Typisierung | 49 |
| 4.1.3.1 | DNS-DNS-Hybridisierung | 49 |
| 4.1.3.2 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 52 |
| 4.1.3.3 | Vergleich der mittels DNS-DNS-Hybridisierung und der Polymerase-Kettenreaktion ermittelten Daten | 54 |
| 4.1.3.4 | Kombinationen der nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene | 55 |
| 4.2 | Etablierung einer diagnostischen Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) | 57 |
| 4.3 | Untersuchungen zur klonalen Verwandtschaft der aviären pathogenen <i>E. coli</i> -Feldstämme | 58 |
| 4.3.1 | Makrorestriktionsanalyse | 58 |
| 4.3.1.1 | Zusammenhang zwischen Restriktionsmustern und Serovaren | 61 |
| 4.3.1.2 | Assoziation zwischen Restriktionsmustern und virulenzassoziierten Genen | 62 |
| 4.3.1.3 | Zusammenhang zwischen Restriktionsmustern und Herkunft | 64 |
| 4.3.1.4 | Infektketten zwischen einzelnen Geflügelbetrieben | 65 |
| 5 | Diskussion | 69 |
| 5.1 | Schlussfolgerungen | 83 |
| 6 | Zusammenfassung | 85 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 89 |

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | |
|-----------------------|--|
| A. bidest | Aqua bidest (destilliertes Wasser) |
| Abb. | Abbildung |
| Aer | Aerobactin |
| APEC | aviäre pathogene <i>Escherichia coli</i> |
| ARP | aviäre respiratorische Phagozyten |
| as | antisense |
| astA | Gen des EAST-1 |
| BGBL | Bundesgesetzblatt |
| bp | Basenpaare |
| BRSS | Blocking Reagenz Stock Solution |
| bzgl. | bezüglich |
| CHEF-PFGE | Contour-clamped homogeneous electric field – Pulsfeld-Gel- elektrophorese |
| CLDT | cytotoletal distending toxin |
| CNF | cytotoxic necrotising factor |
| ColV | ColicinV |
| colV | Gen des ColV |
| °C | Grad Celsius |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| eae | attaching and effacing-Gen |
| EaggEC | enteroaggregative <i>E. coli</i> |
| EAST-1 | EaggEC heat-stable enterotoxin-1 |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EHEC | enterohämorrhagic <i>E. coli</i> |
| ESP | EDTA-Sarcosyl-ProteinaseK |
| EspP | secreted serine protease |
| evtl. | eventuell |
| <i>fimC</i> | Gen des FimC (F1-Fimbrien) |
| fur | ferric uptake regulation |
| FyuA | ferric <i>yersinia</i> uptake A |

| | |
|-------------------------|--|
| <i>fyuA</i> | Gen des FyuA |
| g | Gramm |
| Gal(a1-4)Gal | α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HeLa | human cervix carcinoma |
| HlyE | Hämolysin E |
| <i>hlyE</i> | Gen des HlyE |
| HMWP | high molecular weight protein |
| HPI | high pathogenicity island |
| IBV | Infektiöse Bronchitis Virus |
| i. d. R. | in der Regel |
| IgA | Immunglobulin A |
| <i>irp2</i> | Iron repressible protein2, Gen des HMWP |
| Iss | Increased serum survival |
| <i>iss</i> | Gen des Iss |
| <i>iucD</i> | Gen des Aerobactin |
| Kap. | Kapitel |
| KbE | Kolonie-bildende-Einheiten |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| konz. | konzentriert |
| kbp | Kilobasenpaare |
| KR | koagulierende Reagenzien |
| l | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Lsg. | Lösung |
| LT | Hitze-labil |
| µm | Mikrometer |
| MgCl₂ | Magnesiumchlorid |
| mg | Miligramm |
| MHC | major-histocompatibility complex |
| min | Minuten |

| | |
|----------------------|--|
| ml | Mililiter |
| mM | Milimolar |
| mol | mol |
| MRHA | Mannose-resistente-hämagglutinierende Fimbrien |
| MSHA | Mannose-sensitive-hämagglutinierende Fimbrien |
| Multiplex-PCR | Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NDV | Newcastle Disease Virus |
| NeuNAc | <i>N</i> -acetylneuraminic acid |
| nm | Nanometer |
| NO | Nordosten |
| Nr. | Nummer |
| n. t. | nicht typisierbar |
| NW | Nordwesten |
| OD | Optische Dichte |
| o. g. | oben genannt |
| OMP | äußere Membranproteine |
| Pap | pyelonephritis associated pili |
| <i>papC</i> | Gen des PapC |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pmol | Pikomol |
| RAPD | random amplified polymorphic DNA |
| rLPS | rough lipopolysaccharide |
| RT | Raumtemperatur |
| RTX | repeats-in-toxins |
| s | sense |
| s. | siehe |
| sec | Sekunden |
| sheA | silent <i>E. coli</i> K12 haemolysin |
| SHS | Swollen-Head-Syndrom |
| sLPS | smooth lipopolysaccharide |
| SO | Südosten |
| s. o. | siehe oben |

| | |
|---------------------|-------------------------------------|
| sog. | sogenannte |
| spez. | spezifisch |
| spp. | Spezies |
| ST | Hitze-stabil |
| Stx | Shiga-toxin |
| <i>stx2f</i> | Gen des Shiga-toxin 2f |
| SW | Südwesten |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| Tsh | Temperatur-sensitives Hämagglutinin |
| <i>tsh</i> | Gen des Tsh |
| U | Units |
| u. a. | unter anderem |
| ü. N. | über Nacht |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v. a. | vor allem |
| VT | Verotoxin |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

Danksagung

Prof. Dr. Lothar H. Wieler möchte ich für die Überlassung der Arbeit danken. Außerdem möchte ich mich für die stets gute Betreuung in allen Phasen der Arbeit – insbesondere in den schwierigen – bedanken. Er hatte immer ein offenes Ohr bei allen Problemen und trug stets zur Lösung dieser bei.

Auch bei meinem Kooperationspartner, der Lohmann Tierzucht GmbH in Cuxhaven, möchte ich mich recht herzlich bedanken, sowohl für die großzügige finanzielle Unterstützung als auch für die Bereitstellung der *E. coli*-Wildtypstämme. Namentlich sind Prof. Dr. R. Preisinger, Dr. H. C. Philipp und Dr. M. Voss zu erwähnen, die eine Zusammenarbeit in sehr entspannter aber konstruktiver Atmosphäre ermöglichten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin sei für die Hilfe sowie die gute Atmosphäre, die geprägt war von Spaß und konstruktiver Zusammenarbeit, gedankt. Besonderer Dank gebührt Christa Ewers für die auf allen Ebenen hervorragende Betreuung und das Korrekturlesen der Arbeit, Sabine Kießling für die absolut unverzichtbare Hilfe im Labor, Frau Beutner für die Hilfe bzgl. der Diagnostik der *E. coli*-Isolate und Peter Schwerk für die Lösung aller Computerprobleme.

Weiterhin danke ich Hanna Schell herzlich für ihre fachliche und vor allem private Unterstützung und Ablenkung.

Schließlich und ganz besonders aber möchte ich meiner Familie danken und zwar meinem Mann Jens für das Korrekturlesen der Arbeit sowie für seine unendliche Geduld in den etwas hektischeren Tagen, vor allem in Bezug auf die zahlreichen organisatorischen und computertechnischen Fragen sowie meinen beiden Kindern Luca und Lina, die mir jeden Tag aufs Neue gezeigt haben, dass diese Arbeit zwar wichtig, aber nicht alles im Leben ist.

Lebenslauf

| | |
|-------------------------------------|---|
| Name: | Traute Janßen |
| Geburtsdatum: | 11.09.1968 |
| Geburtsort: | Ihlow |
| Eltern: | Jann Janßen, Landwirt Gisela Janßen, Hausfrau |
| Staatsangehörigkeit: | Deutsch |
| Familienstand: | Verheiratet mit Dr. Jens Kluth, Tierarzt |
| Kinder: | Luca Garriet Janßen, geb. am 01.10.1996 Lina Martha Janßen, geb. am 08.06.2002 |
| Schulausbildung | |
| 1974 – 1978 | Besuch der Grundschule in Westerende-Kirchloog |
| 1978 – 1980 | Besuch der Hermann-Tempel-Schule in Ihlowerfehn |
| 1980 – 1987 | Besuch des Gymnasiums Ulricianums in Aurich |
| Mai 1987 | Erwerb der allgemeinen Hochschulreife |
| Ausbildung und berufliche Tätigkeit | |
| 08/1987 – 01/1990 | Ausbildung zur Rechtsanwalts- und Notargehilfin in der Anwaltskanzlei Steinbömer, Aurich |
| 02/1990 – 09/1991 | Rechtsanwalts- und Notargehilfin in der o. g. Anwaltskanzlei |
| 10/1991 – 09/1992 | Justizangestellte im Landesarbeitsgericht Hannover, Hannover |
| 10/1992 - 09/1999 | Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, Berlin |
| 07.10.1999 | Approbation als Tierärztin in Berlin |
| 01.12.1999 – 31.05.2002 | Doktorandin am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin, Berlin |

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Traute Janßen, die vorliegende Arbeit nur auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Literaturstellen verfasst zu haben.

Traute Janßen

Berlin, den 06.10.2002