

4 Ergebnisse

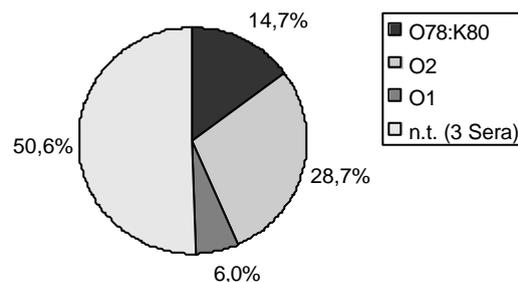
4.1 Charakterisierung der aviären pathogenen *E. coli*-Feldstämme

4.1.1 Biotypisierung

Die zu untersuchenden 150 *E. coli*-Isolate wurden auf Wasserblau-Metachrom-Agar nach Gassner angeimpft und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Durch den Farbumschlag des Differenzierungsmediums von grün nach blau wurde eine Laktoseverwertung festgestellt. Mittels anschließender biochemischer Charakterisierung anhand der Verstoffwechslung diverser Zucker (Abbau von Laktose, anaerobe Verwertung von Glukose) und Aminosäuren (anaerober Abbau von Lysin durch Lysindecaboxylase, Bildung von Indol) erfolgte eine eindeutige Identifizierung der zu untersuchenden Isolate als *E. coli*-Spezies.

4.1.2 Serotypisierung

Mit Hilfe der koagulierenden Reagenzien O1, O2 und O78:K80 wurde die Hälfte aller untersuchten *E. coli*-Isolate diesem Serovar bzw. O-Gruppen zugeordnet. Die O-Gruppe O2 wurde am häufigsten (43 Isolate) nachgewiesen, zu einem geringeren Anteil waren Isolate des Serovars O78:K80 (22) und der O-Gruppe O1 (9) vorhanden (Abb. 3).



n.t. (3 Sera) = nicht typisierbar mit den 3 Seren O1, O2 und O78:K80

Abb. 3 Serotypisierung aviärer pathogener *E. coli* (n = 150)

- Die einzelnen *E. coli*-Isolate wurden mittels Objektträger-Schnellagglutination serotypisiert

4.1.3 Molekularbiologische Typisierung

Um das Vorkommen und die Verteilung der bislang für APEC beschriebenen virulenzassoziierten Gene festzustellen, wurden die *E. coli*-Feldisolate mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion molekular untersucht.

4.1.3.1 DNS-DNS-Hybridisierung

Alle 150 *E. coli*-Isolate wurden auf das Vorkommen der in Tabelle 3 (Kap. 3.2.4) aufgeführten virulenzassoziierten Gene untersucht und anhand der DNS-DNS-Hybridisierung der Dot-Blots (Abb. 4) folgendermaßen nachgewiesen: die für die Untereinheiten der Typ1- und P-Fimbrien kodierenden Gene *fimC* und *papC* waren in 139 (92,7 %) bzw. 35 (23,3 %) aller untersuchten Isolate vorhanden. Die Gene *fyuA* und *irp2*, deren Produkte essentiell für die Eisenaquirierung sind, wurden jeweils in 107 (71,3 %), das Aerobactin-kodierende *iucD* in 116 (77,3 %) Isolaten nachgewiesen. Das *iss*-Gen, welches das entsprechende für die Serumresistenz wichtige Increased Serum Survival Protein kodiert, war in 121 (80,7 %) der 150 Isolate vorhanden. 108 (72,0 %) der untersuchten Stämme besaßen das für ein temperatursensitives Hämagglutinin kodierende *tsh*, während die Gene für die Toxine EAST-1 (*astA*) und Hämolyisin E (*hlyE*) lediglich in 31 (20,7 %) und in 4 (2,7%) Stämmen bzw. für das taubenspezifische Shiga-toxin (*stx2f*) gar nicht nachgewiesen wurden (Abb. 5).

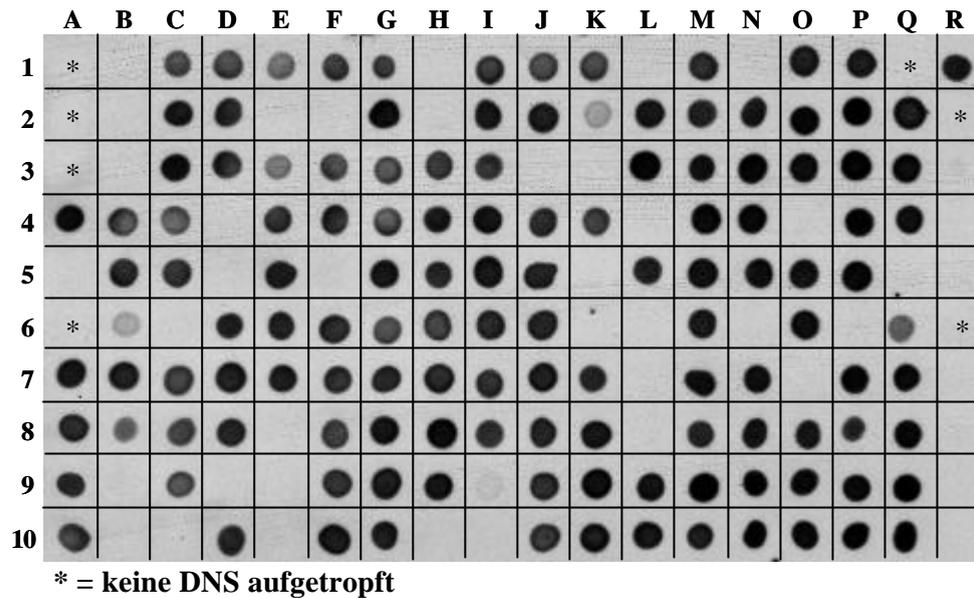


Abb. 4 DNS-DNS-Hybridisierung einer Dot-Blot Membran für den Nachweis von *irp2*

- **Spalte A: Positivkontrollen:** A4: IMT 2540, A5: IMT 2467, A7: IMT 663, A8: IMT 2528, A9: Referenzstamm 17-2 (O3:H2), A10: Referenzstamm H10 404 (O78:K80:H11)
- **R1: eine zusätzliche Positivkontrolle** für den Nachweis der Gene *fyuA* und *irp2*: *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610
- **Spalte R: Negativkontrollen:** R3: *Staphylococcus aureus* DSM 1104, R4: *Erysipelothrix rhusiopathiae* 1166/00, R5: *Salmonella pullorum* 705/1/00, R7: *Campylobacter jejuni* X491/1-99; R8: *Campylobacter jejuni* BgVV607, R9: *Mannheimia haemolytica* DSM 5283 CCUC24141, R10: *Pasteurella multocida* AFA 14
- **Spalten B bis Q: E. coli-Feldisolate**

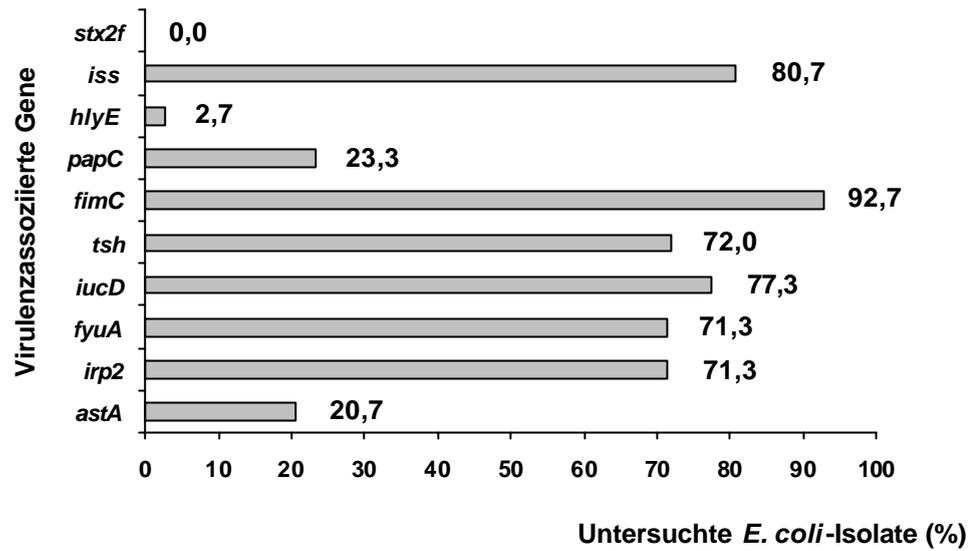
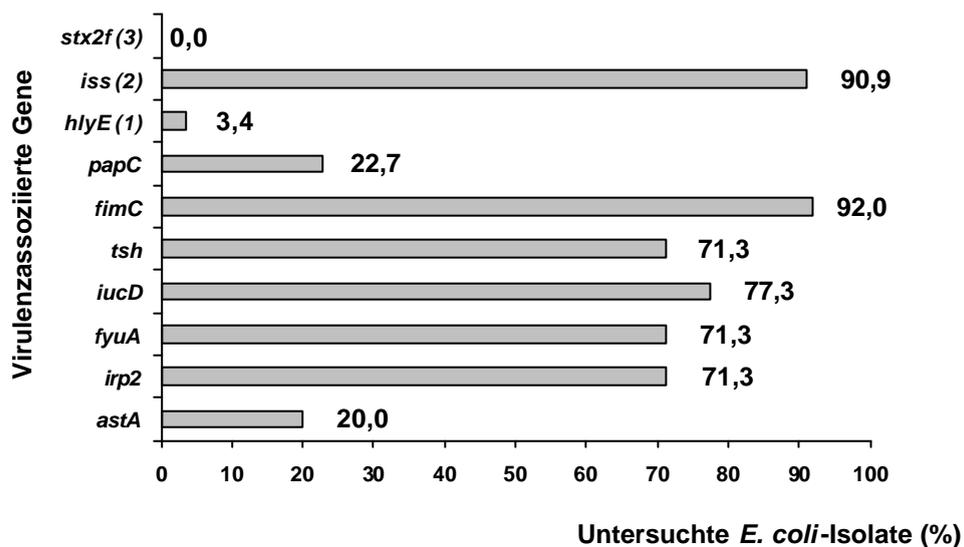


Abb. 5 Nachweis virulenzassoziierter Gene mittels DNS-DNS-Hybridisierung in aviären pathogenen *E. coli* (n = 150)

4.1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die erzielten Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung zu verifizieren, wurden die *E. coli*-Feldisolat zusätzlich mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion auf die virulenz-assoziierten Gene untersucht (Abb. 7). Für den Nachweis von *astA*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh*, *fimC* und *papC* wurden alle 150 Isolate herangezogen. Die genannten Gene wurden folgendermaßen nachgewiesen: *astA* in 30 (20,0 %), *fyuA* und *irp2* in jeweils 107 (71,3 %), *iucD* in 116 (77,3 %), *tsh* in 107 (71,3 %), *fimC* in 138 (92,0 %) und *papC* in 34 (22,7 %) der untersuchten Stämme. Das Vorkommen der Gene *hlyE*, *stx2f* und *iss* wurde nur stichprobenartig in den Isolaten mit dem folgenden Ergebnis untersucht: 3 (3,4 %) der 87 untersuchten Isolate enthielten *hlyE* und in 20 (90,9 %) von 22 Isolaten wurde *iss* nachgewiesen. Das Shiga-toxin-Gen *stx2f* kam in keinem der 64 untersuchten Isolate vor (Abb. 6).



(1) von 87 untersuchten Isolaten (2) von 22 untersuchten Isolaten (3) von 64 untersuchten Isolaten

Abb. 6 Nachweis virulenzassoziiierter Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion in aviären pathogenen *E. coli* (n = 150)

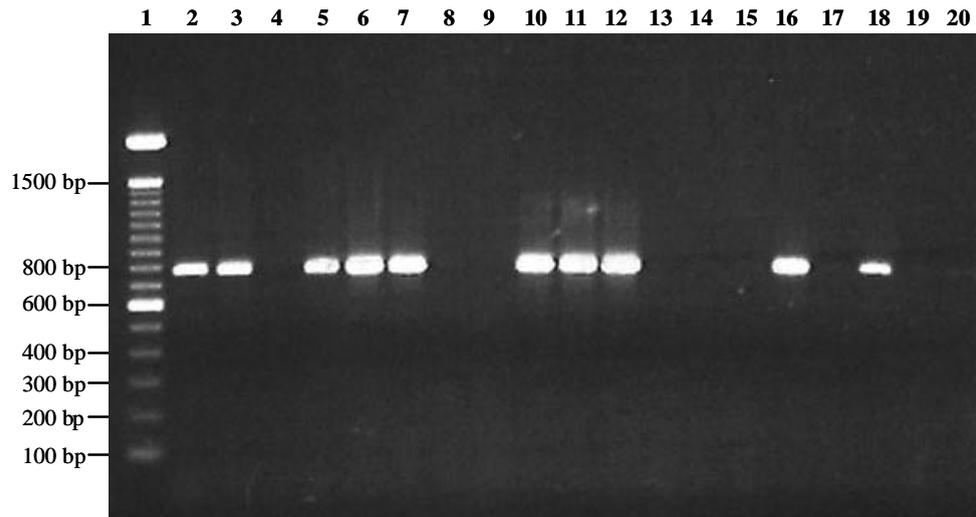


Abb. 7 Elektropherogramm einer Polymerase-Kettenreaktion für den Nachweis von *fyuA* (1,0%-iges Agarose-Gel, 2,0 h, 90 V)

- 1: Marker 100 bp-ladder, 2: Positivkontrolle 17-2 (O3:H2), 3: IMT 2339, 4: IMT 2340, 5: IMT 2341, 6: IMT 2342, 7: IMT 2343, 8: IMT 2344, 9: IMT 2345, 10: IMT 2346, 11: IMT 2347, 12: IMT 2348, 13: IMT 2349, 14: IMT 2350, 15: IMT 2351, 16: IMT 2352, 17: IMT 2353, 18: IMT 2354, 19: IMT 2355, 20: Leerwert
- Das PCR-Amplifikat für *fyuA* besitzt eine Fragmentgröße von 774 bp

4.1.3.3 Vergleich der mittels der DNS-DNS-Hybridisierung und der Polymerase-Kettenreaktion ermittelten Daten

Die erzielten Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stimmten weitestgehend miteinander überein. Die Abbildungen 4 und 6 in Kap. 4.1.3.1 und 4.1.3.2 stellen jedoch die Ergebnisse der PCR und der Hybridisierung lediglich im Ganzen dar und geben über die einzelnen Daten keinen näheren Aufschluss. Aus diesem Grund wurden zusätzlich alle untersuchten Stämme einzeln betrachtet und die jeweiligen Ergebnisse miteinander verglichen. Die virulenzassoziierten Gene *fyuA*, *irp2*, *stx2f*, *hlyE* und *iss* wurden in den *E. coli*-Isolaten mit den beiden genannten Methoden übereinstimmend nachgewiesen. Bzgl. der übrigen virulenzassoziierten Gene gab es zwischen den Ergebnissen der DNS-DNS-Hybridisierung und der PCR geringgradige Abweichungen. Diese sind in den folgenden Tabellen 7 bis 11 näher aufgeschlüsselt.

Tab. 7 - 11 Direkter Vergleich der mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion erzielten Ergebnisse (n = 150)

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	30	0	30
	-	1	119	120
		31	119	150

Tab. 7 Nachweis von *astA*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	115	1	116
	-	1	33	34
		116	34	150

Tab. 8 Nachweis von *iucD*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	107	0	107
	-	1	42	43
		108	42	150

Tab. 9 Nachweis von *tsh*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	138	0	138
	-	1	11	12
		139	11	150

Tab. 10 Nachweis von *fimC*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	34	0	34
	-	1	115	116
		35	115	150

Tab. 11 Nachweis von *papC*

4.1.3.4 Kombinationen der nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene

In den 150 untersuchten Feldisolaten ließen sich die Gene *fyuA* und *irp2* jeweils in 107 (71,3 %)* Stämmen nachweisen, und zwar nur in Kombination. In keinem der untersuchten Isolate kam nur eines der beiden Gene vor. Interessanterweise konnten in 99 (66,0 %)* dieser 107 Isolate zusätzlich *iucD* nachgewiesen werden, was auf die Existenz zweier unabhängig voneinander existierender Eisenaquirierungssysteme schließen lässt. 98 (65,3 %)* der o. g. 99 Isolate besaßen zusätzlich zu den genannten Genen das Fimbriengen *fimC*, lediglich 30 (20,0 %)* das Fimbriengen *papC*. 92 (61,3 %)* bzw. 89 (59,3 %)* der *fyuA-irp2-iucD* positiven Isolate besaßen zusätzlich *tsh* bzw. *iss*. In 20 (13,3 %)* der o. g. 99 Stämme ließ sich zusätzlich *astA* nachweisen. Die Genkombination *fyuA, irp2, iucD, fimC, iss* und *tsh* kam in 53 (35,3 %)* der 150 *E. coli*-Isolate vor und war damit am häufigsten vorhanden.

Die auf dem ColV-Plasmid gelegenen Gene *iss, iucD* und *tsh* kamen bei 97 (64,7 %)* der untersuchten 150 *E. coli*-Isolate vor. Die Toxingene *tsh* und *astA* konnten in Kombination bei 18 (12,0 %)* der Isolate nachgewiesen werden. Die beiden Fimbriengene *fimC* und *papC* waren zusammen in 33 (22,0 %)* aller untersuchten Stämme vorhanden. Lediglich in 5 (3,3 %)* aller untersuchten Isolate ließen sich alle bislang genannten Gene *astA, fyuA, irp2, iucD, tsh, fimC, papC* und *iss* nachweisen. Sämtliche Genkombinationen sowie die Häufigkeit ihres Auftretens in den untersuchten *E. coli*-Isolaten sind in der Tabelle 12 dargestellt. Da das Shigatoxingen *stx2f* in keinem der 150 Isolate nachgewiesen wurde, ist es in der Tabelle nicht berücksichtigt.

* die Prozentzahlen in den Klammern beziehen sich auf die Gesamtzahl der untersuchten *E. coli*-Isolate (n = 150)

Tab. 12 Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen virulenzassoziierten Genen

Virulenzassoziierte Gene									Häufigkeit	Prozent
<i>fimC</i>	<i>iss</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>irp2</i>	<i>fyuA</i>	<i>papC</i>	<i>astA</i>	<i>hlyE</i>	n	%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4,0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,7
0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0,7
0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,7
0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0,7
0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0,7
1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2,7
1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1,3
1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0,7
1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0,7
1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	2,0
1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0,7
1	0	1	0	1	1	1	1	0	3	2,0
1	0	1	1	1	1	1	0	0	6	4,0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	10	6,6
1	1	0	0	0	0	0	1	0	2	1,3
1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0,7
1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0,7
1	1	0	1	1	1	0	0	0	3	2,0
1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0,7
1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0,7
1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0,7
1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0,7
1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0,7
1	1	1	1	0	0	0	0	0	6	4,0
1	1	1	1	0	0	1	0	0	3	2,0
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0,7
1	1	1	1	1	1	0	0	0	53	35,3
1	1	1	1	1	1	0	0	1	3	2,0
1	1	1	1	1	1	0	1	0	10	6,7
1	1	1	1	1	1	1	0	0	14	9,3
1	1	1	1	1	1	1	1	0	5	3,3
Gesamt									150	100

0 = negativ

1 = positiv

4.2 Etablierung einer diagnostischen Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR)

Die Multiplex-PCR soll als Diagnostikum für aviäre pathogene *E. coli* (APEC) eingesetzt werden, mit der die Isolate auf sechs virulenzassoziierte Gene gleichzeitig getestet werden. Es handelt sich hierbei um das Toxin *astA*, die für Eisenaquirierung wichtigen Gene *irp2* und *iucD*, das *iss*, welches entscheidend in der Anti-Wirtsabwehr ist, das Fimbriengen *papC* sowie *tsh*, welches das entsprechende Protein kodiert. Als Template-DNS wurden anfangs sowohl jeweils 2 µl Hitzelyse als auch, zum Vergleich, jeweils eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes eingesetzt, direkt von der LB-Agar- oder Blutagar-Platte entnommen. Die mittels Kolonien erzielten Ergebnisse der Multiplex-PCR waren mit denen der Hitzelyse identisch, so dass schließlich zwecks Vereinfachung des Diagnostikums nur noch Kolonien als Template-DNS eingesetzt wurden (Abb. 8).

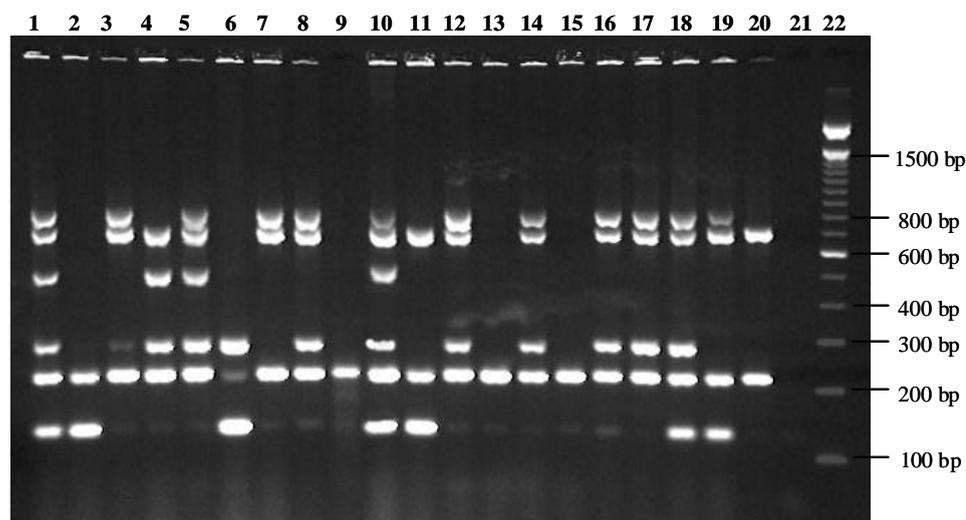


Abb. 8 Elektropherogramm einer Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (1,5%-iges Agarose-Gel, 2,5 h, 90 V)

- 1: Positivkontrolle IMT 2540, 2: IMT 4537, 3: IMT 4539, 4: IMT 4641, 5: IMT 5124, 6: IMT 2111, 7: IMT 2488, 8: IMT 4532, 9: IMT 5127, 10: IMT 5215, 11: IMT 5125, 12: IMT 2297, 13: IMT 2275, 14: IMT 2293, 15: IMT 2282, 16: IMT 2283, 17: IMT 2271, 18: IMT 2272, 19: IMT 2264, 20: IMT 2265, 21: Leerwert, 22: Marker 100 bp-ladder
- Die einzelnen PCR-Amplifikate besitzen folgende Fragmentgrößen: *astA* 120 bp, *iss* 219 bp, *irp2* 287 bp, *papC* 519 bp, *iucD* 711 und *tsh* 823 bp.

4.3 Untersuchungen zur klonalen Verwandtschaft der aviären pathogenen *E. coli* -Feldstämme

4.3.1 Makrorestriktionsanalyse

Insgesamt wurde die genomische DNS von 150 *E. coli*-Feldisolaten mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I verdaut und anschließend in der Contour-Clamped Homogeneous Electric Field – Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) untersucht. Die Abbildung 9 zeigt exemplarisch ein Elektropherogramm von 11 *E. coli*-Feldisolaten.

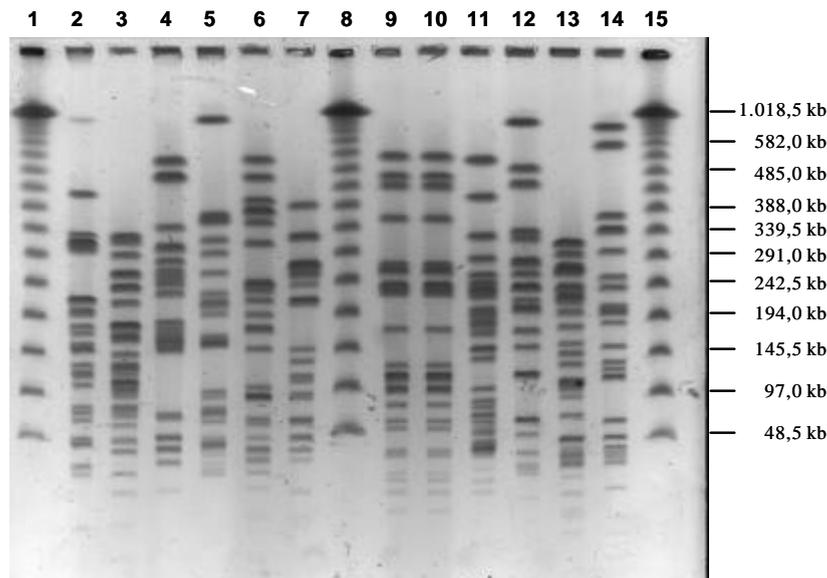


Abb. 9 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogenous Electric - Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *Xba*I-verdauten APEC-Stämme

- 1, 8 und 15: Lambda Ladder PFG Marker, 2: IMT 2279, 3: IMT 2280, 4: IMT 2281, 5: IMT 2282, 6: IMT 2283, 7: IMT 2284, 9: IMT 2285, 10: IMT 2286, 11: IMT 2287, 12: IMT 2288, 13: IMT 2289, 14: Referenzstamm 17-2 (O3:H2)
- Laufzeit 22 h; Temperatur 14 °C; Winkel 120 °; Spannung 6 V; Pulszeit 5-50 sec; Ramping linear

Die Verwandtschaft aller Isolate, basierend auf der Ähnlichkeit ihrer Restriktionsfragment-Längenprofile, wurde mit dem Computerprogramm Gelcompar[®] analysiert und in Form eines Dendrogramm dargestellt.

Insgesamt wurden zwar 171 *E. coli*-Isolate analysiert, es ergab sich jedoch bei bis zu sechs Isolaten eine 100%-ige Übereinstimmung der Restriktionsfragment-Längenprofile. Diese Isolate stammen überwiegend aus dem gleichen Betrieb, so dass für die epidemiologische Studie jeweils nur ein Stamm pro Gruppe oder, sofern die Isolate verschiedener Herkunft waren, mehrere Stämme berücksichtigt wurden. Somit verblieben für die weiteren Analysen insgesamt 150 *E. coli*-Isolate, die bereits in den Kapiteln 4.1 und 4.2 beschrieben wurden. Die Verwandtschaft dieser Stämme sowie deren Einteilung in Cluster, Subcluster, Gruppen und Subgruppen ist der Abbildung 10 zu entnehmen sowie in einem Dendrogramm (Abb. 11) dargestellt.

Nach der Restriktion mit *Xba*I liessen sich die 150 *E. coli*-Isolate in zwei klonale Gruppen (Cluster I und II) unterteilen, die zueinander eine Ähnlichkeit von 60,9 % aufwiesen. Jedes dieser Cluster war wiederum in zwei Subcluster unterteilt, welche zueinander eine Ähnlichkeit von 80,1 % (IA und IB) sowie 93,1 % (IIA und IIB) besaßen. Die interne Übereinstimmung der letztgenannten Subcluster lag bei 94,4 % (IIA) und 95,6 % (IIB), so dass eine weitere Unterteilung nicht vorgenommen wurde. Das Subcluster IA ließ sich wiederum in zwei Gruppen (IAa und IAb) mit einer Ähnlichkeit von 85,0 % unterteilen. Auch hier wurde aufgrund der hohen internen Übereinstimmung von 90,6 % keine weitere Unterteilung der Gruppe IAb vorgenommen. Die Gruppe IAa schließlich ließ sich in sechs Subgruppen (1 bis 6) unterteilen, die eine Ähnlichkeit von 87,9 % aufwiesen. Die interne Übereinstimmung innerhalb dieser einzelnen Subgruppen lag bei 94,7 % (1), 91,9 % (2), 94,2 % (3), 91,3 % (4), 91,9 % (5) und 96,5 % (6).

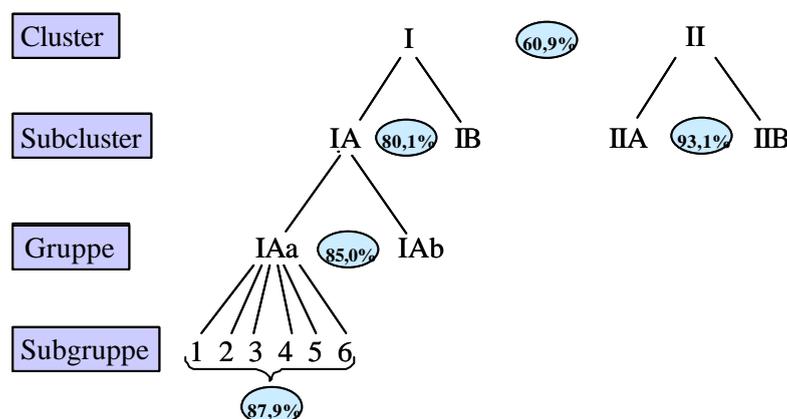


Abb. 10 Einteilung der mittels CHEF-PFGE untersuchten 150 *E. coli*-Isolate

Die Prozentzahlen in den ovalen Feldern geben die klonale Ähnlichkeit zwischen den jeweiligen Clustern, Subclustern, Gruppen und Subgruppen wieder

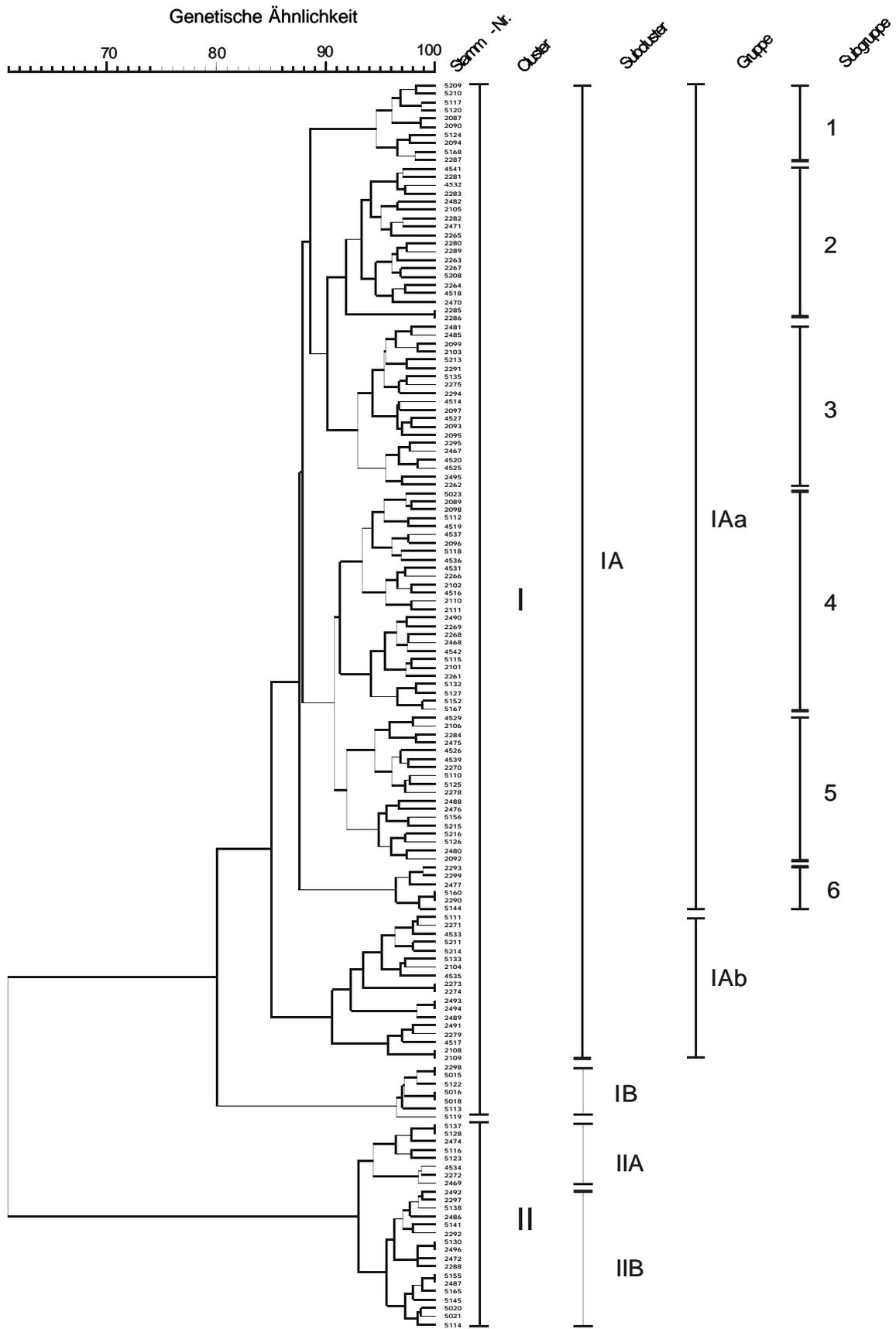


Abb. 11 Stammbaum aviärer pathogener *E. coli*-Isolate, errechnet auf der Basis der genotypischen Ähnlichkeit nach Restriktion mit *Xba*I (n = 150)

4.3.1.1 Zusammenhang zwischen Restriktionsmustern und Serovaren

In zwei Subgruppen des Cluster I sowie in Cluster II waren deutlich Zusammenhänge zwischen Serovar und Restriktionsmuster erkennbar. In der Subgruppe 1 des Clusters I waren ausschließlich *E. coli*-Isolate des Serovars O78:K80 vorhanden. Isolate der O-Gruppe O2 fanden sich zu einem hohen Anteil in der Subgruppe 6 sowie im Cluster II. Auffällig war ebenfalls die Häufung der nicht typisierbaren Isolate in den Subgruppen 2 und 5 (Cluster I) sowie in dem Subcluster IB. In den anderen Gruppen bzw. Subgruppen war eine entsprechende Assoziation zwischen den Serovaren sowie den Makrorestriktionsmustern nicht feststellbar. Die Ergebnisse der Makrorestriktionsanalysen und der Assoziation zu den Serovaren sind in der Tabelle 13 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 13 Assoziation von Serovar und PFGE-Gruppen aviärer pathogener *E. coli*-Isolate nach Restriktion mit der Endonuklease *Xba*I (n = 150)

PFGE-Gruppe	Serovar bzw. O-Gruppe	Häufigkeit (n)	Prozent bezogen auf Gesamt (%)	Prozent bezogen auf PFGE-Gruppe (%)
IAa 1	O78:K80	10	6,6	100
IAa 2	O1	1	0,7	5,3
IAa 2	O2	3	2,0	15,7
IAa 2	O78:K80	1	0,7	5,3
IAa 2	n. t. (3 Sera)	14	9,3	73,7
IAa 3	O1	3	2,0	15,0
IAa 3	O2	4	2,7	20,0
IAa 3	O78:K80	5	3,3	25,0
IAa 3	n. t. (3 Sera)	8	5,3	40,0
IAa 4	O1	1	0,7	3,7
IAa 4	O2	3	2,0	11,1
IAa 4	O78:K80	5	3,3	18,5
IAa 4	n. t. (3 Sera)	18	12,0	66,7
IAa 5	O1	1	0,7	5,6
IAa 5	O2	1	0,7	5,6
IAa 5	n. t. (3 Sera)	16	10,6	88,8
IAa 6	O2	5	3,3	83,3
IAa 6	O78:K80	1	0,7	16,7
IAb	O1	3	2,0	16,7
IAb	O2	4	2,7	22,2
IAb	O78:K80	1	0,7	5,6
IAb	n. t. (3 Sera)	10	6,6	55,5
IB	O2	1	0,7	14,3
IB	n. t. (3 Sera)	6	4,0	85,7
IIA	O2	7	4,7	87,5
IIA	n. t. (3 Sera)	1	0,7	12,5
IIB	O2	15	10,0	88,2
IIB	n. t. (3 Sera)	2	1,3	11,8
Gesamt		150	100	

4.3.1.2 Assoziation zwischen Restriktionsmustern und virulenzassoziierten Genen

Ein Zusammenhang zwischen den Makrorestriktionsmustern und der Assoziation zu den virulenzassoziierten Genen konnte deutlich in dem Cluster II sowie im Subcluster IB festgestellt werden. Die virulenzassoziierten Gene *fimC*, *iss*, *iucD*, *tsh*, *irp2* sowie *fyuA* waren jeweils zu 100 % in diesen PFGE-Gruppen nachweisbar. In der Subgruppe 6 des Clusters I waren fünf der sechs oben erwähnten Gene ebenfalls in jedem dieser Subgruppe zugehörigem Isolat vorhanden, lediglich das für die Eisenaquirierung wichtige Gen *iucD* war nur in 50 % der Isolate nachweisbar. In keinem der genannten PFGE-Gruppen wurde das Fimbriengen *papC* nachgewiesen. Auch in der Subgruppe 1 des Clusters I wurden die virulenzassoziierten Gene *fimC* (100 %), *iss* (90 %), *iucD*, *tsh*, *irp2*, *fyuA* (jeweils 80 %) sowie das *papC* (40 %) vermehrt nachgewiesen, allerdings konnte hier das Toxigen *astA* in keinem der Isolate festgestellt werden. Demgegenüber war in der Subgruppe 5 des Clusters I lediglich *astA* in 44,4 % der Isolate überdurchschnittlich häufig vorhanden, während die Gene *fimC* (72,2 %), *iss* (66,7 %), *iucD*, *tsh* (jeweils 44,4 %) sowie *irp2* und *fyuA* (jeweils 22,2 %) in dieser Subgruppe selten nachgewiesen wurden. Drei der vier Isolate, die das Hämolysegen *hlyE* enthalten, befanden sich in der Subgruppe 4, das vierte Isolat in der Subgruppe 2 des Clusters I. Zusammenfassend sind in den Abbildungen 12 bis 21 die Verteilung der virulenzassoziierten Gene für die jeweiligen PFGE-Gruppen dargestellt.

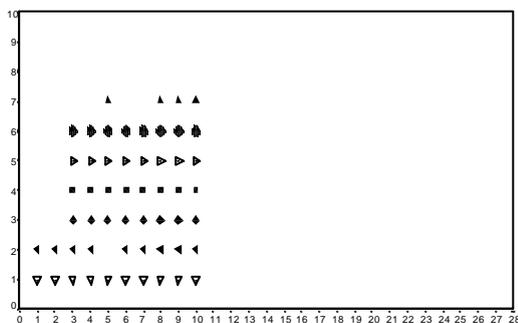


Abb. 12 Subgruppe 1 d. Clusters I (n = 10)

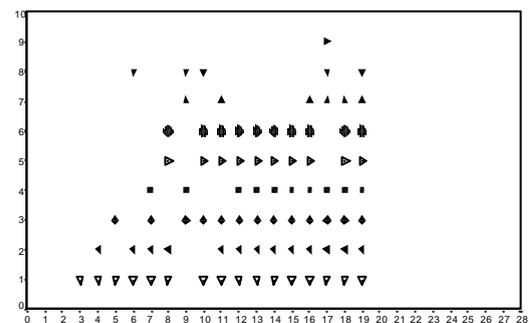


Abb. 13 Subgruppe 2 d. Clusters I (n = 19)

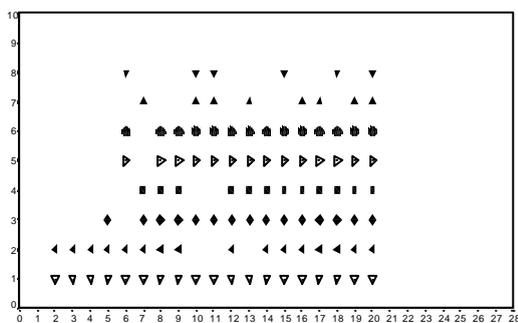


Abb. 14 Subgruppe 3 d. Clusters I (n = 20)

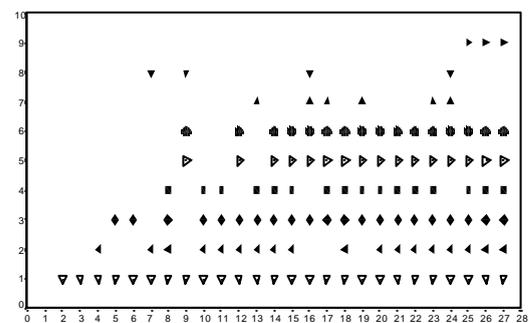


Abb. 15 Subgruppe 4 d. Clusters I (n = 27)

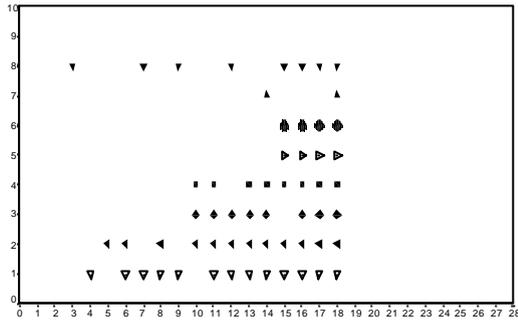


Abb. 16 Subgruppe 5 d. Clusters I (n = 18)

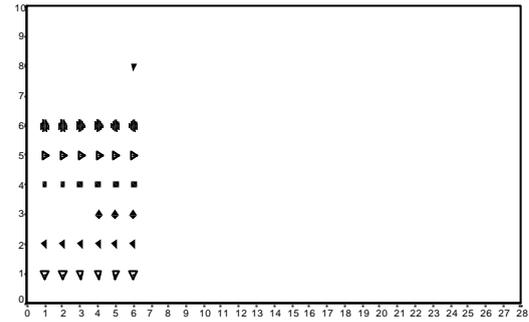


Abb. 17 Subgruppe 6 d. Clusters I (n = 6)

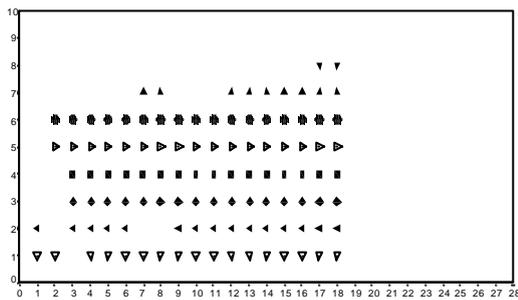


Abb. 18 Gruppe Iab d. Clusters I (n = 18)

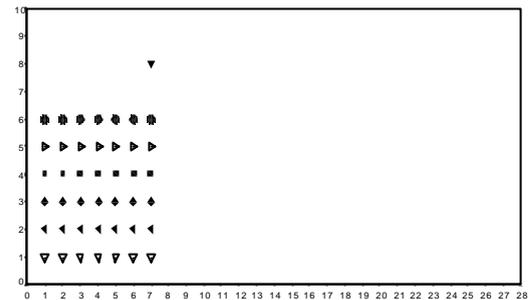


Abb. 19 Subcluster IB d. Clusters I (n = 7)

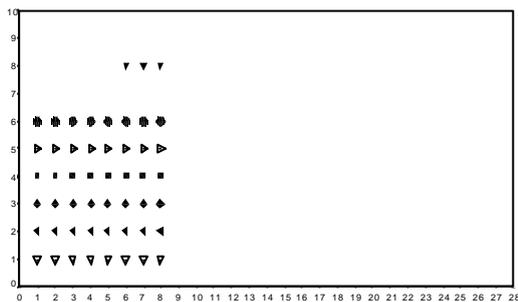


Abb. 20 Subcluster IIA d. Clusters II (n = 8)

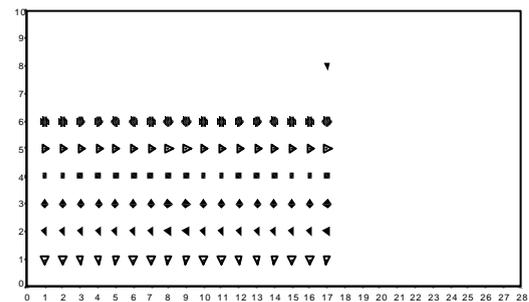


Abb. 21 Subcluster IIB d. Clusters II (n = 17)

Abb. 12 – 21 Assoziation von virulenzassoziierten Genen und PFGE-Gruppen aviärer pathogener *E. coli*-Isolaten nach Restriktion mit der Endonuklease *Xba*I (n = 150)

Legende zu den obigen Diagrammen:

- **x – Achse:** numerische Darstellung der den jeweiligen PFGE-Gruppen zugehörigen aviären pathogenen *E. coli*-Isolaten (n = 150)
- **y – Achse:** numerische Darstellung der virulenzassoziierten Gene; 1: *fimC*; 2: *iss*; 3: *iucD*; 4: *tsh*; 5: *irp2*; 6: *fyuA*; 7: *papC*; 8: *astA*; 9: *hlyE*

4.3.1.3 Zusammenhang zwischen Restriktionsmustern und Herkunft

In allen Subclustern, Gruppen und Subgruppen sind *E. coli*-Isolate aus dem Nordwesten Deutschlands am häufigsten vertreten. Eindeutige Assoziationen zwischen den Restriktionsmustern und der Herkunft sind allerdings nur in der Subgruppe 6 des Clusters I sowie in dem Subcluster IB zu erkennen, in denen alle Isolate aus dem Nordwesten stammen (jeweils 100 %), sowie in der Subgruppe 1 (Cluster I) und der Gruppe IIB, in der 90,0 % bzw. 94,1 % der *E. coli*-Stämme aus Betrieben in Nordwestdeutschland isoliert wurden. In den anderen PFGE-Gruppen sind deutliche Zusammenhänge zwischen Herkunft und Restriktionsmuster nicht erkennbar. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Tabelle 14 dargestellt

Tab. 14 Assoziation von Herkunft und PFGE-Gruppen aviärer pathogener *E. coli*-Isolate nach Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I

PFGE-Gruppe	Herkunft	Häufigkeit (n)	Prozent, bezogen auf Gesamt (%)	Prozent, bezogen auf PFGE-Gruppe (%)
IAa 1	Nordwesten	9	6,0	90,0
IAa 1	Nordosten	1	0,7	10,0
IAa 2	Nordwesten	7	4,7	36,8
IAa 2	Nordosten	2	1,3	10,5
IAa 2	Südwesten	2	1,3	10,5
IAa 2	Südosten	6	4,0	31,6
IAa 2	Ägypten	1	0,7	5,3
IAa 2	unbekannt	1	0,7	5,3
IAa 3	Nordwesten	14	9,3	70,0
IAa 3	Nordosten	2	1,3	10,0
IAa 3	Südwesten	1	0,7	5,0
IAa 3	Südosten	1	0,7	5,0
IAa 3	Ägypten	2	1,3	10,0
IAa 4	Nordwesten	15	10,0	55,6
IAa 4	Nordosten	3	2,0	11,1
IAa 4	Südwesten	6	4,0	22,2
IAa 4	Südosten	1	0,7	3,7
IAa 4	Jordanien	1	0,7	3,7
IAa 4	unbekannt	1	0,7	3,7
IAa 5	Nordwesten	11	7,3	61,1
IAa 5	Nordosten	5	3,3	27,8
IAa 5	Südosten	2	1,3	11,1
IAa 6	Nordwesten	6	4,0	100,0
IAb	Nordwesten	4	2,7	22,2
IAb	Nordosten	4	2,7	22,2
IAb	Südwesten	5	3,3	27,8
IAb	Südosten	2	1,3	11,1
IAb	Jordanien	3	2,0	16,7
IB	Nordwesten	7	4,7	100,0
IIA	Nordwesten	3	2,0	37,5
IIA	Nordosten	2	1,3	25,0
IIA	Südwesten	1	0,7	12,5
IIA	Großbritannien	2	1,3	25,0
IIB	Nordwesten	16	10,6	94,1
IIB	Jordanien	1	0,7	5,9
Gesamt		150	100	

4.3.1.4 Infektketten zwischen einzelnen Geflügelbetrieben

Schließlich wurde die genomische DNS von ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* verdauten 37 *E. coli*-Isolaten in der CHEF-PFGE untersucht. Die Abbildung 22 zeigt exemplarisch ein Elektropherogramm von 11 *E. coli*-Feldisolaten. 16 dieser 37 Isolate sind bereits in der epidemiologischen Analyse der 150 *E. coli*-Isolate enthalten, die verbleibenden 21 Isolate wurden hierfür nicht berücksichtigt, da sie eine 100%-ige Übereinstimmung mit einem oder mehreren Stämmen aufwiesen und aus dem gleichen Betrieb isoliert worden waren (siehe Kap. 4.3.1).

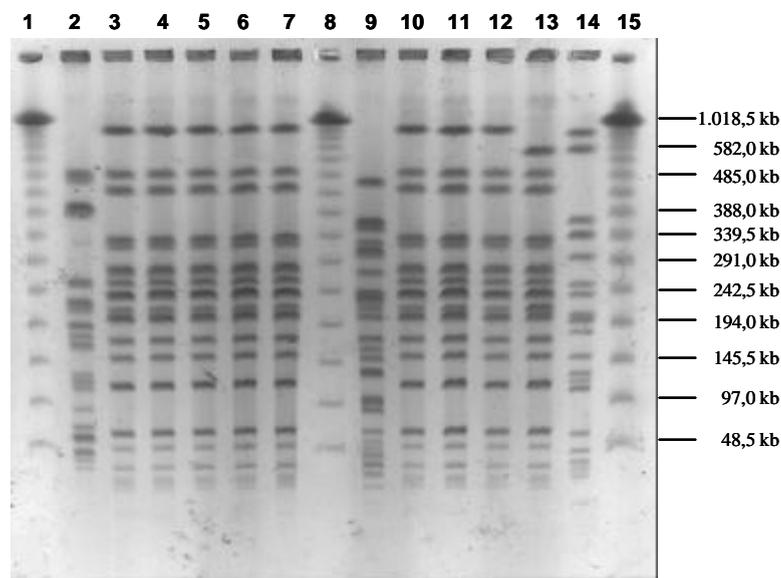


Abb. 22 Elektropherogramm der Contour-Clamped Homogenous Electric - Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE) der *XbaI*-verdauten APEC-Stämme

- 1, 8 und 15: Lambda Ladder PFG Marker, 2: IMT 5133, 3: IMT 5130, 4: IMT 5162, 5: IMT 5158, 6: IMT 5146, 7: IMT 5164, 9: IMT 5144, 10: IMT 5149, 11: IMT 5142, 12: IMT 5139, 13: IMT 5137, 14: Referenzstamm 17-2 (O3:H2)
- Laufzeit 22 h; Temperatur 14 °C; Winkel 120 °; Spannung 6 V; Pulszeit 5-50 sec; Ramping linear

Die Verwandtschaft aller Isolate wurde ebenfalls mit dem Computerprogramm Gelcompar[®] analysiert und in Form eines Dendrogrammes dargestellt. Ziel dieser Analyse war es, nähere Aufschlüsse über evtl. Infektketten zwischen den einzelnen Betrieben und dem Restriktionsmuster zu erhalten. Diese Isolate stammen ausschließlich aus einer einzigen Region in Nordwestdeutschland, und zwar aus sechs verschiedenen Betrieben, die teilweise miteinander in Kontakt stehen (Tab. 15)

Tab. 15 Herkunft aviärer pathogener *E. coli* (APEC) unter Berücksichtigung der Betriebsform (n = 37)

Herkunft (regional)	Betrieb	Betriebsform	Häufigkeit (n)	Prozent (%)
Nordwesten	A	Aufzucht	26	70,3
Nordwesten	B	Produktion	4	10,8
Nordwesten	C	Aufzucht	4	10,8
Nordwesten	D	Aufzucht	1	2,7
Nordwesten	E	Mast	1	2,7
Nordwesten	F	Aufzucht	1	2,7
Gesamt			37	100

- Der Produktionsbetrieb B beliefert die Aufzuchtbetriebe A und C
- Die Aufzuchtbetriebe D und F sowie der Mastbetrieb E stehen weder untereinander noch mit den Betrieben A, B und C in Kontakt

Nach der Restriktion mit *Xba*I liessen sich die 37 *E. coli*-Isolate in zwei klonale Gruppen (Cluster I und II) unterteilen, die zueinander eine Ähnlichkeit von 77,1 % aufwiesen. Das Cluster II besaß eine interne Übereinstimmung von 94,7 %. Das Cluster I ließ sich weiter in zwei Subcluster unterteilen, welche zueinander eine Ähnlichkeit von 89,1 % besaßen. Die interne Übereinstimmung dieser Subcluster lag bei 91,8 % (IA) und 96,1 % (IB). Eine weitere Unterteilung wurde nicht vorgenommen (Abb. 23).

Die 37 *E. coli*-Feldisolate wurden ebenfalls mittels DNS-DNS-Hybridisierung sowie Polymerase-Kettenreaktion auf das Vorkommen und die Verteilung der in Tabelle 3 (Kap. 3.2.4) aufgeführten Gene untersucht. Die Ergebnisse beider Methoden stimmten exakt miteinander überein. *HlyE* sowie *stx2f* konnten in keinem der untersuchten Isolate nachgewiesen werden, das Toxingen *astA* war lediglich in einem Isolat (2,7 %), das Fimbriengen *papC* in zwei Isolaten (5,4 %) vorhanden. Demgegenüber konnten *fyuA* und *irp2* in jeweils 34 (91,9 %), *iucD*, *iss* und *tsh* in jeweils 33 (89,2 %) sowie *fimC* in 36 (97,3 %) Isolaten überdurchschnittlich häufig nachgewiesen werden (Abb. 23).

Die Kombination dieser letztgenannten sechs Gene kam in 30 (81,0 %) der untersuchten *E. coli*-Stämme vor, diese gehörten ausschließlich dem Cluster I an. Während die Verteilung der virulenzassoziierten Gene im Cluster I einheitlich war (*astA*, *hlyE*, *stx2f* und *papC* – negativ, *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh* und *iss* – positiv), sind in Cluster II lediglich zwei Isolate mit identischer Verteilung der Gene vorhanden.

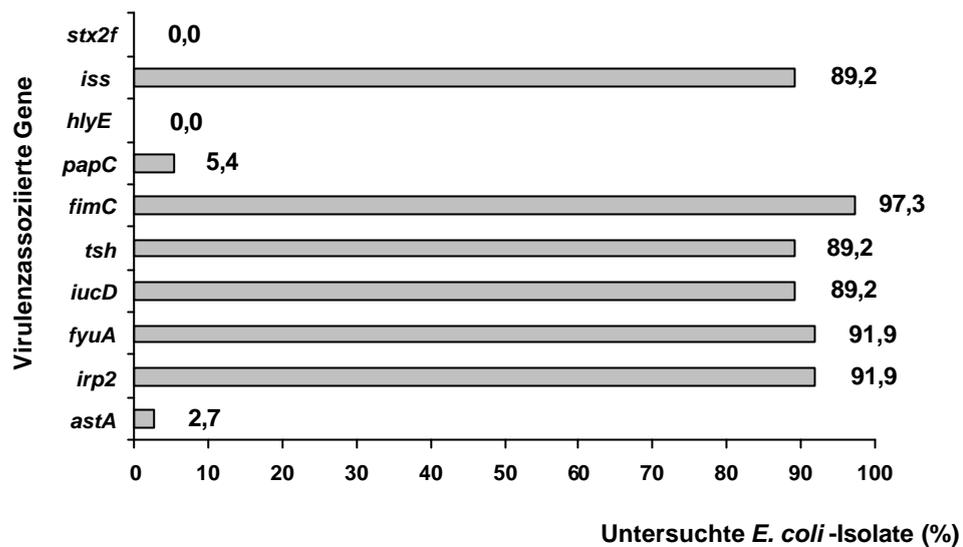


Abb. 23 Nachweis virulenzassoziierter Gene mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion in aviären pathogenen *E. coli* (n = 37)

In dem Cluster I sind *E. coli*-Isolate der Betriebe A, B und C enthalten, die alle der O-Gruppe O2 angehörten. Insgesamt bildeten sich drei Gruppen mit jeweils sechs, acht und neun Isolaten, sowie zwei Pärchen, die eine 100%-ige Übereinstimmung besaßen. In einem dieser Gruppen waren sowohl Isolate des Betriebes A als auch des Betriebes B enthalten. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der betrieblichen Herkunft der Isolate und den Restriktionsmustern war deutlich in diesem Cluster I erkennbar. In dem Cluster II befanden sich *E. coli*-Isolate der Betriebe A, C, D, E und F. Diese Isolate gehörten den O-Gruppen O1 (Betrieb A) und O2 (Betriebe A, C und F) sowie dem Serovar O78:K80 (Betrieb D) an bzw. waren mit diesen 3 Seren nicht typisierbar (Betriebe C und E). Zusammenfassend sind die Verwandtschaft dieser Stämme, deren Einteilung in Cluster und Subcluster sowie deren Herkunft dem Dendrogramm in der Abbildung 24 zu entnehmen.

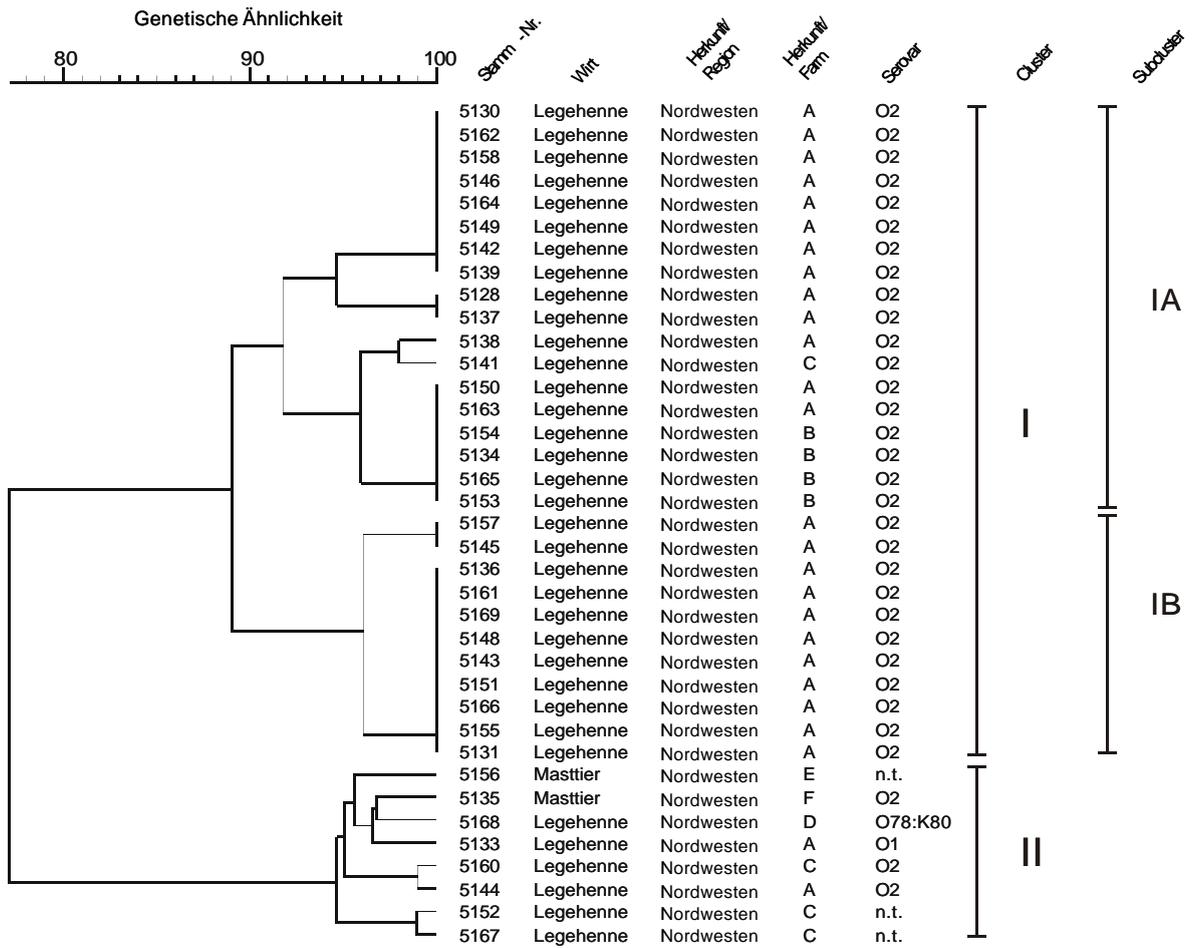


Abb. 24 Stammbaum aviärer pathogener *E. coli*-Isolate, errechnet auf der Basis der genotypischen Ähnlichkeit nach Restriktion mit *Xba*I (n = 37)