

5 Diskussion

Die aviäre Kolibazillose ist eine häufig vorkommende und mit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten verbundene Erkrankung des Wirtschaftsgeflügels [10]. Trotz zahlreicher in vitro- und in vivo-Untersuchungen ist bislang jedoch nicht geklärt, mit welchen Mechanismen aviäre pathogene *E. coli* (APEC) in der Lage sind, diese Infektion zu verursachen. Die meisten aviären *E. coli*-Isolate gehören zur normalen Mikroflora im Darm des Geflügels und besitzen bestimmte für den Wirt wichtige Stoffwechselfunktionen. Diese apathogenen Isolate finden sich somit auch in der Umgebung der Vögel. Mittels horizontalem Gentransfer können jedoch einige dieser apathogenen *E. coli*-Isolate pathogen werden, sofern das übertragene Genmaterial für spezifische Virulenzfaktoren kodiert. Erst dann sind diese nunmehr aviären pathogenen *E. coli* (APEC) in der Lage, Erkrankungen aus dem Symptomenkomplex der Kolibazillose zu verursachen. Aufgrund ihrer durch Virulenzfaktoren erworbenen Fitness verbreiten sich diese APEC nun selektiv und klonal in der Geflügelpopulation. Zu den bisher untersuchten Virulenzfaktoren zählen u. a. F1- [4, 5, 24, 25, 29-31, 45, 72, 87, 88, 119] und P-Fimbrien [29, 30, 85-88, 109, 112] sowie Curli [73], Aerobactin [8, 16, 35, 38, 57, 65, 68, 77] und Yersiniabactin [41, 64, 99, 100], die zwei voneinander unabhängige eisenaquirierende Systeme darstellen, das Hämagglutinin HlyE [92], das Temperatursensitive Hämagglutinin [34, 73, 89, 103], verschiedene Wirtsabwehrsysteme, zu denen äußere Membranproteine [120], das Iss-Protein [84], der Lipopolysaccharid-Komplex [119, 120], Kapsel [15, 120] sowie die Colicin-Produktion gehören [84, 111, 120] und schließlich verschiedene Toxine [82, 95, 98].

Ein wesentliches Problem stellt in diesem Zusammenhang die Identifizierung eines APEC-Wildtypstammes dar. Die bislang gebräuchliche und als Diagnostikum eingesetzte Serotypisierung reicht nicht aus, apathogene *E. coli*-Isolate, die in der Mikroflora von gesundem und auch erkranktem Geflügel zu finden sind, von den pathogenen aviären *E. coli*-Isolaten zu differenzieren, da aufgrund dieser Phänotypisierung die spezifischen Virulenzfaktoren, die mit der Kolibazillose in Verbindung gebracht werden, nicht ermittelt werden können.

Weiterhin liegen bislang trotz der großen Bedeutung dieser Erkrankungen nur sehr wenige epidemiologische Arbeiten vor, die näheren Aufschluss über die Einschleppungswege, die Verbreitung und die weiteren Ursachen der Kolibazillose geben [106]. Um

Informationen v. a. über die genotypischen Merkmale aviärer pathogener *E. coli* Stämme zu erhalten, wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit 150 APEC-Stämme untersucht, die überwiegend von Geflügelbetrieben aus dem gesamten Bundesgebiet über einen Zeitraum von 10 Jahren isoliert wurden. Eine vergleichbare Studie wurde unseres Wissens in Deutschland bislang noch nicht durchgeführt.

Aviäre pathogene *E. coli* gehören laut Literaturangaben in erster Linie nur wenigen O-Gruppen an. Vor allem Isolate der O-Gruppen O78, O1 und O2 sind für die meisten Infektionen verantwortlich [27]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nur die Hälfte aller untersuchten APEC-Stämme auf der Grundlage der Objektträger-Schnellagglutination den Serovaren bzw. O-Gruppen O78:K80, O1 und O2 zugeordnet werden. Die Serotypisierung stellt allerdings nach wie vor die klassische Methode zur Charakterisierung pathogener *E. coli* dar. So belegen unsere Daten nachdrücklich, dass diese Methode unzureichend zur Identifizierung von *E. coli*-Wildtypstämmen als APEC-Stämme ist, da die Serotypisierung einen unverhältnismäßig hohen Grad an Selektion ausübt. Einerseits konnten 50 % aller untersuchten *E. coli*-Wildtypstämmen mithilfe dieser drei Seren nicht typisiert werden, obwohl diese Isolate aus den Organen von an Kolibazillose verendetem Geflügel stammen. Andererseits gibt die Zuordnung eines Wildtypstammes zu einem der genannten O-Gruppen bzw. Serovare keine sichere Aussage über die Virulenz des jeweiligen Isolates. Ein Problem stellt hier sowohl die genetische Diversität innerhalb als auch die Übereinstimmung zwischen den jeweiligen *E. coli*-Serogruppen dar [27, 116, 117]. Zweifelsfrei lassen sich aviäre pathogene *E. coli*-Isolate somit nur durch zusätzliche diagnostische Untersuchungsmethoden charakterisieren und identifizieren.

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war es deshalb, durch Überprüfung einer Vielzahl von virulenzassoziierten Genen deren Vorkommen bei APEC zu überprüfen. Als Methoden bieten sich hier u. a. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie die DNS-DNS-Hybridisierung an. Während die DNS-DNS-Hybridisierung v. a. bei Testung einer großen Zahl von Isolaten bevorzugt werden sollte, stellt bei der Diagnostik einzelner Isolate die PCR die Methode der Wahl dar. Deshalb wurden in dieser Arbeit beide Methoden etabliert. Schließlich wurde eine Makrorestriktionsanalyse mittels Pulfsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) etabliert, um Aufschlüsse bzgl. der klonalen Verwandtschaft der untersuchten APEC-Isolate zu erhalten.

Mittels PCR sowie DNS-DNS-Hybridisierung wurden die aviären pathogenen *E. coli* auf zehn virulenzassoziierte Gene untersucht. Es handelte sich hierbei um *astA*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh*, *iss*, *papC*, *fimC*, *hlyE* und *stx2f*. Die Auswahl der Gene erfolgte aufgrund einer ersten Studie, die im Institut während der Jahre 1998 und 1999 durchgeführt wurde. Damals wurden insgesamt 17 virulenzassoziierte Gene an einem größeren APEC-Kollektiv mittels PCR getestet. In dieser Studie konnte belegt werden, dass die Shiga-toxin-Gene *stx1* und *stx2*, die Gene für das Hitze-labile und das Hitze-stabile Enterotoxin (*est*, *elt*), für die Zytonekrose-Faktoren 1 und 2 (*cnf1/2*), sowie für den Cytolethal distending factor (*cdtb*) und den Anheftungsfaktor Intimin (*eae*) gar nicht oder nur in Einzelfällen bei APEC vorkommen. Weiterhin konnte auch belegt werden, dass die drei Hämolsine Alpha-Hämolysin (Hly_{alpha}), EHEC-Hämolysin (Hly_{EHEC}) und Hämolysin E (HlyE) bei APEC nicht vorkommen [58].

Obwohl in der genannten Arbeit das HlyE nicht nachgewiesen wurde, nahmen wir es trotzdem in die vorliegende Untersuchung mit auf, denn dieses Gen wurde als APEC-spezifisch publiziert [92]. Aus einem ähnlichen Grund wurde auch das Gen *stx2f* in die Untersuchungen mit einbezogen, da dieses Gen bislang ausschließlich bei *E. coli*-Stämmen nachgewiesen wurde, die von Tauben isoliert worden waren [43, 74, 98]. Allerdings war dieses Gen in keinem einzigen APEC-Stamm vorhanden, während die anderen neun virulenzassoziierten Gene in den Isolaten nachgewiesen wurden. Die von Tauben isolierten *Stx2f*-produzierenden *E. coli* besitzen zusätzlich häufig Gene die für Intimin und das Cytolethal distending toxin (CLDT) kodieren. Diese Toxine stellen in der Pathogenese des Durchfallgeschehens beim Menschen wichtige Virulenzfaktoren dar. Ob allerdings die *Stx2f*-produzierenden *E. coli* als eine Gesundheitsgefahr für den Menschen angesehen werden können ist fraglich, da diese Isolate wirtsadaptiert zu sein scheinen [43, 74]. Aufgrund des fehlenden Nachweises von *stx2f* in aviären pathogenen *E. coli* scheint das entsprechende Toxin in der Pathogenese der Kolibazillose jedenfalls keine Rolle zu spielen.

Als weiteres Toxin wurde in 31 (20,7 %) Stämmen das für das enteroaggregative hitze-stabile Toxin (EAST-1) kodierende *astA* nachgewiesen. Dieses Toxin aktiviert die Guanylat-Zyklase und ist in der Wirkung dem Hitze-stabilen Toxin der enterotoxischen *E. coli* (ETEC) ähnlich. Genetisch und immunologisch unterscheiden sich die Toxine jedoch erheblich [121]. Aufgrund der Lokalisation von *astA* auf einem Transposon ist es sowohl in verschiedenen mit Durchfallgeschehen assoziierten *E. coli*-Isolaten nachweisbar, als auch zu einem großen Anteil (38,0 %) in apathogenen *E. coli*-Stämmen [75, 96, 121]. Aus diesem

Grund kann die Bedeutung des EAST-1-Toxins für die Pathogenese der Kolibazillose zur Zeit nicht bewertet werden. Sollte das Toxin in die Wirtszellen des Geflügels eindringen können, dann ist jedoch eine Wirkung vorstellbar. Als mögliche Zielzellen kommen auch Zellen des Respirationstraktes in Betracht. So inhibiert z. B. die Adenylat-Zyklase von *Bordetella bronchiseptica*, einem der wichtigsten lungenpathogenen Bakterium der Haus- und Nutztiere, sowohl die Aufnahme der Bakterien als auch nach Aufnahme in die Wirtszelle den „respiratory burst“ der Alveolarmakrophagen. Bereits internalisierte Bordetellen haben somit eine höhere Überlebenschance [53]. Ähnliche Effekte sind bislang bezüglich des EAST-1 nicht gezeigt worden, allerdings wurde das Toxin auch bislang bevorzugt bei darmpathogenen *E. coli*-Bakterien nachgewiesen [96, 121].

Laut Literaturangaben werden neben den Toxinen auch Hämolsine mit der Kolibazillose in Verbindung gebracht. Zu diesen zählen das Temperatur-sensitive Hämagglutinin (Tsh) sowie das Hämolysin E. Das letztgenannte Hämolysin E (HlyE) ist ein neues, „Porenformendes“ Toxin, das in zahlreichen pathogenen *E. coli*-Isolaten, aber auch in *Salmonella typhi*- sowie *Shigella flexneri*-Stämmen nachgewiesen wurde und eine neue Klasse von Zytotoxinen repräsentiert [113]. Kodiert wird Hämolysin E durch das *hlyE*-Gen, welches zwar als spezifisch für aviäre pathogene *E. coli* beschrieben wird [92], jedoch bislang weder phänotypisch noch genotypisch in APEC-Isolaten nachgewiesen werden konnte [8, 39, 58, 65, 90]. In dieser Arbeit konnte in vier (2,7 %) der 150 untersuchten *E. coli*-Wildtypstämme mittels DNS-DNS-Hybridisierung das *hlyE* nachgewiesen werden, zusätzlich zeigten drei dieser Isolate eine vollständige Hämolyse auf Schafblutagar. Das geringe Vorkommen des *hlyE* belegt zweifelsfrei, dass es sich um kein APEC-spezifisches Gen handelt.

Im Gegensatz zu dem Hämolysin E scheint das APEC-spezifische Hämagglutinin Tsh als Virulenzmerkmal für Kolibazillose von großer Bedeutung zu sein. Es handelt sich um ein Autotransporter-Protein, welches starke Ähnlichkeiten mit den ImmunglobulinA-Proteasen vom Serin-Typ aufweist [89, 103]. Das entsprechende Gen *tsh* ließ sich sowohl in dieser Arbeit (72,0 %) als auch in anderen Studien in einer Vielzahl von APEC-Stämmen nachweisen, welche von den Organen der an Kolibazillose verendeten Tiere isoliert wurden [58, 78]. Des weiteren konnten Maurer et al., 1998 [73] in keinem einzigen *E. coli*-Isolat, das von gesunden Tieren stammte, *tsh* nachweisen. Dozois et al., 2000 [34] stellten zudem fest, dass eine enge Assoziation zwischen dem Vorkommen von *tsh* und der Virulenz der jeweiligen APEC besteht. Somit könnte *tsh* einen spezifischen genetischen Virulenzmarker

für APEC-Isolate darstellen, auch im Hinblick darauf, dass dieses Gen für keine anderen Bakterien beschrieben worden ist. In weiteren Untersuchungen ist allerdings immer die Lokalisation des *tsh* zu überprüfen, da es sowohl episomal als auch chromosomal nachgewiesen werden konnte [17, 34]. *Tsh* wurde ursprünglich als Teil einer genomischen Insel beschrieben. Es ist also nicht auszuschließen, dass dieses Gen bei einzelnen APEC-Stämmen in mehreren Kopien vorkommt. Eine solche Beobachtung wurde bereits bei enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen der Serovar O26:H- gemacht. Auch hier konnte das Vorliegen von zwei Genkopien eines Autotransporter-Proteins bewiesen werden, es handelt sich in diesem Falle um EspP. Die gleichzeitige Lokalisation von *tsh* auf Chromosom und Plasmid konnte zwar bislang noch nicht festgestellt werden, ist aber nicht auszuschließen. In diesem Falle ist es möglich, dass das Gen unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen ist. Unterstrichen wird die hypothetische Lokalisation des *tsh* durch eine Studie, in der die Sekretion von Tsh sowie die Fähigkeit der Hämagglutination bei bestimmten Temperaturen vergleichend in *E. coli* K-12 und einem APEC-Wildtypstamm untersucht wurde [103]. Auch konnten große Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen, die das *tsh* flankieren und Sequenzen in der Nähe von Pathogenitätsinseln (PAI) sowie auf Virulenzplasmiden anderer Bakterien festgestellt werden, u. a. in verschiedenen *Yersinia*-Spezies und in uropathogenen *E. coli* [34]. Eine Untersuchung von Guillot et al., 1988 [44] konnte des weiteren belegen, dass Plasmide von *E. coli* in der Lage sind, innerhalb kürzester Zeit im Darm von Hühnern zu transferieren. Dieser horizontale Genaustausch könnte eine Erklärung dafür sein, dass aviäre pathogene *E. coli* eine Vielzahl von virulenzassoziierten Genen besitzen, weitaus mehr, als dies bislang bei anderen *E. coli*-Pathovaren beschrieben ist.

Am häufigsten wurde in dieser Arbeit übereinstimmend mit diversen anderen Studien das für F1-Fimbrien kodierende *fimC* nachgewiesen (92,7 %). F1-Fimbrien sind filamentöse Organellen auf der Oberfläche von zahlreichen, sowohl mammären als auch aviären *E. coli*-Stämmen [32, 83]. Mithilfe dieser Fimbrien sind APEC-Isolate in der Lage, sich an die Epithelzellen des Respirationstraktes (Lunge, Luftsack und Trachea) anzuheften [30, 31, 71, 85, 86]. Zudem ermöglicht FimC den *E. coli*-Isolaten eine Persistenz in den Makrophagen und erhöht somit die Überlebensrate im Wirt [81, 83]. Allerdings sind F1-Fimbrien bzw. das entsprechende *fimC* weder als Virulenzmarker noch als spezifisches Diagnostikum für APEC geeignet, da auch jeder zweite apathogene *E. coli* diese Fimbrien besitzt [29, 119].

Neben den F1-Fimbrien wurde auf das Vorkommen von P-Fimbrien in APEC-Isolaten untersucht. Diese Fimbrien lassen sich häufig bei *E. coli*-Isolaten nachweisen, die extraintestinale Erkrankungen verursachen, v. a. Infektionen der oberen Harnwege bei Menschen und Hunden, bei neonatalen Meningitiden sowie Bakteriämien beim Schwein [59, 60]. P-Fimbrien werden auch von aviären pathogenen *E. coli* exprimiert, allerdings in deutlich geringerem Umfang als F1-Fimbrien (hier: 23,3 %). Sie ermöglichen den APEC die Besiedlung von Luftsack und Lunge und, im Gegensatz zu den F1-Fimbrien, auch die Adhärenz an innere Organe, wie z. B. Herz, Leber oder Nieren, sind also auch für die systemische Infektion relevant [30, 88, 109, 112]. P-Fimbrien stellen somit nach derzeitigem Wissen einen wichtigen Virulenzfaktor in der Pathogenese der Kolibazillose dar, allerdings ist anzunehmen, dass noch weitere bislang unbekannte Faktoren für die Anheftung und die daraus resultierende Schädigung der inneren Organe und damit für den systemischen Infektionsverlauf verantwortlich sind, da sich das *papC*-Gen in nur rund einem Viertel der hier untersuchten Stämme nachweisen ließ.

Eine weitere Voraussetzung für die systemische Verbreitung einer Infektion ist v. a. auch die Resistenz gegenüber bestimmten Wirtsabwehrsystemen. Hier stellt das Iss-Protein (Increased Serum Survival) neben äußeren Membranproteinen, den Lipopolysacchariden sowie dem ColicinV einen wichtigen Faktor dar. Durch das Iss-Protein ist den APEC-Stämmen eine erhöhte Überlebensrate im Blut möglich, so dass sie über die Blutbahn zu den inneren Organen gelangen und dort die typischen Läsionen verursachen. Das entsprechende *iss*-Gen konnte in 121 (80,7 %) der in dieser Arbeit untersuchten 150 aviären pathogenen *E. coli*-Isolate nachgewiesen werden. Da entsprechende Zahlen durch die Literatur bestätigt werden, stellt *iss* sicherlich einen wichtigen Indikator zur Identifizierung von APEC-Stämmen dar, auch wenn es, jedoch in deutlich geringerem Umfang (18,7 %), ebenfalls in apathogenen *E. coli* vorhanden ist [84]. Da Iss jedoch erst vor kurzem als Virulenzfaktor in APEC-Isolaten identifiziert wurde, sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die bislang erzielten Resultate zu verifizieren.

Wichtige Bedeutung in der Pathogenese der Kolibazillose kommt ebenfalls der Eisen-aquirierung zu. In den untersuchten APEC-Stämmen konnten drei virulenzassoziierte Gene nachgewiesen werden, die eine zentrale Rolle im Eisenstoffwechsel spielen. Es handelt sich um *fyuA*, *irp2* und *iucD*. Die beiden erstgenannten Gene sind chromosomal auf einer sog. „high pathogenicity island“ (HPI) lokalisiert, die ursprünglich für hochpathogene *Yersinien*

beschrieben wurde [18]. Die auf dieser HPI vorhandenen Gencluster sind in die Biosynthese, den Transport sowie die Regulation der Siderophore Yersiniabactin involviert. In diversen Studien wurde die HPI auch in zahlreichen *E. coli*-Stämmen nachgewiesen, und zwar zu einem hohen Anteil in enteroaggregativen *E. coli* (EAaggEC) sowie in extraintestinalen *E. coli*, die aus Infektionen des Urogenitaltraktes (UPEC) und aus Fällen von Septikämie des Menschen isoliert wurden [33, 64, 99, 100]. In einer Studie von Gophna et al., 2001a [41] konnten verschiedene Gene, die auf der HPI lokalisiert sind, in 22 von insgesamt 26 untersuchten aviären pathogenen *E. coli* (APEC), vor allem der O-Gruppen O78 und O2, nachgewiesen werden. Auch hier spielt der horizontale Gentransfer der HPI zwischen *Yersinien*-Spezies und einigen pathogenen *E. coli* offensichtlich eine große Rolle und ermöglicht diesen pathogenen Isolaten eine optimale Anpassung an ihre Umwelt und damit verbunden ein Überleben in bestimmten ökologischen Nischen [64]. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 150 APEC-Isolate auf das Vorkommen der Gene *fyuA* und *irp2* untersucht. Sie wurden in 71,3 % der untersuchten Isolate und nur in Kombination nachgewiesen.

IucD schließlich ist ein Bestandteil des *iucABCD*-Operons, welches für Aerobactin kodiert, einer Siderophore vom Hydroxamat-Typ, die ebenfalls für die Eisenaufnahme von *E. coli*-Isolaten essentiell ist. In Übereinstimmung mit zahlreichen Untersuchungen [8, 29, 35, 68, 77, 78] konnte in der vorliegenden Arbeit *iucD* in 116 (77,3 %) *E. coli*-Isolaten sehr häufig nachgewiesen werden. Interessanterweise kamen die genannten drei Gene *fyuA*, *irp2* und *iucD* zusammen in 99 (66,0 %) aller untersuchten 150 APEC-Isolate sehr häufig vor. Das bedeutet, dass mindestens zwei völlig voneinander unabhängige Eisenaquirierungssysteme nebeneinander existieren. Das muss als Beleg für die Wichtigkeit gedeutet werden, die Eisen für das Wachstum der APEC im Wirt darstellt. Dies weist jedoch auch auf die Rolle von Eisen als Regulator verschiedener Gene während der Pathogenese hin. So werden mehr als 90 Gene in verschiedenen *E. coli*-Isolaten durch Eisen bzw. das sog. „Fur“-Protein (ferric uptake regulation) reguliert, u. a. solche, die für bestimmte Virulenzfaktoren, wie z. B. Colicin, Hämolyse oder auch Shigatoxine kodieren [50]. APEC-Isolate müssen in der Lage sein, an verschiedenen Lokalisationen (u. a. im Respirationstrakt, in der Blutbahn, in inneren Organen und an serösen Häuten) und daraus resultierend unter verschiedenen Bedingungen das essentielle Eisen aufzunehmen, eine Fähigkeit, mit der die Pathogenität aviärer pathogener *E. coli* deutlich erhöht ist. Welche genaue Rolle *fyuA* und *irp2* und damit verbunden die „high pathogenicity island“ (HPI) für die APEC-Vermehrung im Erkrankungsbild der Kolibazillose

spielen, kann nur in nachfolgenden Infektionsversuchen geklärt werden. Bislang wurde die HPI zumindest nicht als Virulenzfaktor im Erkrankungsbild der Kolibazilliose angesehen, allerdings wurde deren häufiges Vorkommen bei APEC auch erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben [58].

Der horizontale Gentransfer der chromosomal lokalisierten HPI von ursprünglich *Yersinia pestis* auf pathogene *E. coli* und auch zwischen verschiedenen *E. coli*-Spezies begründet einmal mehr die Tatsache, dass APEC diese Vielzahl an virulenzassoziierten Genen besitzen. Weitere potenzielle Virulenzgene sind bei *E. coli*-Stämmen zusätzlich auf Plasmiden lokalisiert, die ebenfalls in der Lage sind, zu transferieren. Auch bezüglich der aviären pathogenen *E. coli* liegen Daten vor, die dies unterstreichen. Bei diesen Pathogenen stellen Plasmide der ColicinV (ColV) –Gruppe eine wichtige genetische Basis für Virulenzfaktoren dar. Nach Literaturangaben ist neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten virulenzassoziierten Genen *tsh*, *iucD* und *iss* zusätzlich das ColV-Gen-Cluster auf diesem Plasmid lokalisiert. Die drei erstgenannten Gene ließen sich in dieser Arbeit in 97 (64,7 %) und somit in rund zwei Drittel aller untersuchten Isolate gemeinsam nachweisen. Eventuell könnte dieses Plasmid einen Virulenzmarker für die Kolibazilliose darstellen, was durch eine Studie von Ike et al., 1992 [57] unterstrichen wird, in der die Virulenz von APEC-Isolaten mit und ohne Plasmid untersucht wurde. Nach Verlust des Plasmids wurde eine deutlich reduzierte Virulenz festgestellt, welche nach Wiedereinführung in den Wildtypstamm wiederum voll hergestellt war. Diese Arbeiten belegten jedoch auch, dass die Stämme ohne das ColV-Plasmid zwar eine deutlich geringere Virulenz aufwiesen, aber nicht avirulent waren. Demnach müssen im Genom noch weitere virulenzassoziierte Faktoren kodiert sein, die zusätzlich für die Virulenz der APEC verantwortlich sind und/oder mit den auf dem Plasmid lokalisierten Virulenzgenen interagieren. Diese Annahme wird auch durch eine Studie von Johnson et al., 2002 [62] belegt. In dieser Arbeit wurde ein ca. 100 kb großes R-Plasmid nachgewiesen, auf dem verschiedene virulenzassoziierte Gene, u. a. *iss*, *tsh*, *iucA* sowie Colicin- und Antiinfektiva-Resistenzgene lokalisiert waren, in einen *E. coli* K-12-Stamm transferiert (Transkonjugant) und anschließend die Virulenz mittels Embryo-Letalitätstest untersucht. Während der APEC-Wildtypstamm 80 % der Embryonen tötete, wurden durch den Transkonjuganten lediglich 20 % getötet.

In jedem Falle müssen in weiteren Experimenten die ColV-Plasmide einiger APEC-Stämme isoliert und sequenzanalysiert werden. Es zeigt sich immer wieder, dass Plasmide eine Vielzahl von virulenzassoziierten Genen aufnehmen können, sie stellen einen sehr variablen Genpool dar. In diesem Zusammenhang muss auch das Vorliegen von Resistenzgenen gegen Antiinfektiva, im Besonderen gegen die häufig in der Geflügelhaltung als Futterzusatzstoffe eingesetzten Tetracykline, genannt werden [62]. Auch diesbezüglich könnten die ColV-Plasmide eine wichtige Funktion besitzen, da die APEC aufgrund der Resistenzgene natürlich im Habitat Darm bzw. in der Umwelt selektive Vorteile besitzen. Zusätzlich könnten mittels der Sequenzanalyse evtl. bislang noch unbekannte virulenzassoziierte Gene identifiziert werden. Einschränkend ist hier jedoch auf die teilweise hohe Rate an horizontalem Gentransfer hinzuweisen, durch die ständig neue Plasmidvarianten mit entsprechend neuer Verteilung der Virulenzfaktoren entstehen. Ein weiteres Problem ist, dass APEC-Isolate häufig mehrere große Plasmide besitzen, auf denen die Virulenzfaktoren verteilt sein können. Da jedoch das ColV-Plasmid eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Kolibazillose einnimmt, sind weiterführende in vitro- sowie auch in vivo-Untersuchungen in dieser Richtung dringend notwendig. Aufgrund der Charakterisierung zahlreicher *E. coli*-Wildtypstämme und der damit verbundenen Identifizierung typischer, d. h. mit bestimmten virulenzassoziierten Genen ausgestatteten APEC-Isolaten ist mit der vorliegenden Arbeit eine wichtige Grundlage geschaffen worden, die o. g. Untersuchungen gezielt durchführen zu können.

Bei Auswertung der Literatur sowie Gesprächen mit diagnostisch tätigen Institutionen wird immer wieder deutlich, dass die eindeutige Differenzierung zwischen apathogenen und aviären pathogenen *E. coli* ein außerordentlich großes Problem darstellt. Eine eindeutige Differenzierung ist jedoch zwingend notwendig, um pathogene Isolate zu identifizieren und z. B. als Grundlage für Impfstämme auszuwählen. Dies lässt sich alleine durch die Serotypisierung nicht durchführen, was durch die hier vorgestellten Daten offensichtlich wird. Einerseits gehört eine Vielzahl von APEC-Wildtypstämmen nicht den gängigen Serovaren O1:K1, O2:K2 und O78:K80 an, des weiteren gibt auch ein positiver Serotypisierungsbefund nur unzureichend Aufschluss bzgl. der Virulenz des entsprechenden Isolates. Aus diesem Grund war es ein Anliegen der vorliegenden Arbeit, als diagnostisches Werkzeug eine Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) zu etablieren, mit der es innerhalb kürzester Zeit möglich ist, Aufschlüsse über Vorkommen und Verteilung verschiedener virulenzassoziiierter Gene zu erhalten und so *E. coli*-Wildtypstämme als aviär pathogen zu identifizieren und auf

die Virulenz der jeweiligen Wildtypstämme zurückzuschließen. Basis hierfür waren die mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermittelten Ergebnisse. Um eine entsprechende Multiplex-PCR routinemäßig anwenden zu können, musste vorher die Validität der PCR überprüft werden. Die hier erarbeiteten Daten belegten eine sehr hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von DNS-DNS-Hybridisierung und PCR, weshalb die Multiplex-PCR als Diagnostikum empfohlen werden kann.

Mithilfe dieser Multiplex-PCR, die unseres Wissens bislang noch nicht beschrieben wurde, ist es möglich innerhalb weniger Stunden eine Aussage zu treffen, ob es sich um aviäre pathogene oder um apathogene *E. coli* handelt. Insgesamt können so sechs virulenzassoziierte Gene (*astA*, *irp2*, *iss*, *papC*, *iucD* und *tsh*) gleichzeitig nachgewiesen werden. Vor allem der Nachweis der APEC-spezifischen Gene *iss* und *tsh*, die in apathogenen Isolaten nur in geringer Anzahl nachgewiesen wurden [73, 84], erlauben Aussagen zur Pathogenität des Isolates, während die weiteren, nicht APEC-spezifischen Gene *astA*, *papC*, *iucD* und *irp2* Aufschluss über die Virulenz geben und damit die Differenzierung der pathogenen *E. coli* von den apathogenen Isolaten untermauern. Da nach den Ergebnissen *irp2* und *fyuA* nur in Kombination auftreten, lässt sich folglich auch bzgl. des Vorkommens von *fyuA* eine Aussage mithilfe dieser Multiplex-PCR treffen. Die virulenzassoziierten Gene *stx2f* und *hlyE* wurden in der vorliegenden Arbeit nicht bzw. nur in wenigen Isolaten nachgewiesen, so dass davon auszugehen ist, dass sie in der Pathogenese der Kolibazillose keine entscheidende Rolle spielen. Das Fimbriengen *fimC* schließlich wurde aufgrund des häufigen Vorkommens in apathogenen *E. coli*-Isolaten (s. o.) nicht berücksichtigt.

Die Multiplex-PCR könnte in Zukunft die Serotypisierung als gebräuchliches Diagnostikum ablösen. Durch den gleichzeitigen genotypischen Nachweis von sechs virulenzassoziierten Genen und durch die simple Methode der DNS-Gewinnung (es werden lediglich Bakterien-Kolonien des zu untersuchenden *E. coli*-Wildtypstammes eingesetzt) stellt sie ein schnelles, kostengünstiges und zudem exaktes diagnostisches Werkzeug dar. Für die Multiplex-PCR kann zwar direkt eingesandtes Probenmaterial (z. B. Kot, Staub, Blut oder betroffene Organe) nicht eingesetzt werden, allerdings sind *E. coli*-Isolate sehr leicht und vor allem schnell zu isolieren, so dass eine Etablierung der Methode im Hinblick auf die o. g. Proben nicht erforderlich ist. Aufgrund des Vorkommens und der Verteilung virulenzassoziiierter Gene in den einzelnen Kolonien können prospektive besonders virulente Isolate identifiziert und als Grundlage für Impfstämme ausgewählt werden. Des weiteren

können mithilfe der Multiplex-PCR Infektionsquellen ausfindig gemacht und damit die Verschleppung der aviären pathogenen *E. coli*-Isolate in verschiedene Bestände verhindert werden. Das Muster der Virulenzfaktoren steht nämlich direkt im Zusammenhang mit der Klonalität der jeweiligen Bakterien. In der Zukunft können die Daten auch zur Generierung von Genchips dienen, entsprechende Entwicklungen sind in der Humanmedizin bereits fortgeschritten. So wurde z. B. inzwischen ein *E. coli*-Pathochip vorgestellt. Dieser Mikrochip macht sich den Nachweis der bislang bekannten Vielzahl von *E. coli*-Virulenzfaktoren und Pathogenitätsinseln durch die entsprechend aufgespotteten Gene zunutze [47]. Diese Technik kann problemlos auf Virulenzfaktoren tierpathogener *E. coli* ausgeweitet werden bzw. viele der Virulenzfaktoren besitzen sowohl human- als auch tierpathogene *E. coli*-Stämme.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, mittels Makrorestriktionsanalyse die klonale Verwandtschaft der APEC-Stämme sowie eventuelle Assoziationen zu den Serovaren, der Verteilung der Virulenzgene und der regionalen Herkunft festzustellen. Deshalb wurden die APEC-Stämme, die über einen Zeitraum von 11 Jahren von Geflügelbetrieben aus dem gesamten Bundesgebiet isoliert worden waren sowie zehn Stämme aus Beständen aus Ägypten, Jordanien und Großbritannien, zusätzlich mittels Makrorestriktionsanalyse untersucht. Mehr als die Hälfte dieser APEC-Stämme kamen aus dem Nordwesten Deutschlands (61,1 %), allerdings aus neun verschiedenen Regionen und insgesamt 19 verschiedenen Geflügelbeständen. Nach durchgeführter Makrorestriktion und anschließender Analyse mittels des Computerprogramms Gelcompar[®] wurden die Stämme, die identische Bandenmuster aufwiesen sowie aus dem gleichen Betrieb stammten und denselben Serovaren angehörten, für die weitere Analyse nicht berücksichtigt. Damit sollte sichergestellt werden, dass ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen APEC-Stämmen für die Auswertung zur Verfügung stand und somit die epidemiologische Aussagekraft erhöht werden konnte. Diese APEC-Stämme wurden sowohl von einem diagnostisch tätigen Labor von den Organen der an Kolibazilliose verendeten Tiere isoliert, als auch von wenigen Lieferanten an das genannte Labor übersandt und anschließend als Kolonien an uns zwecks Untersuchung weitergeleitet. Somit hat hier eine gewisse Vorselektion stattgefunden.

Aus der Makrorestriktionsanalyse ist ersichtlich, dass die APEC-Stämme klonal eng miteinander verwandt sind. Die 150 Stämme ließen sich in zwei große Cluster unterteilen, die untereinander eine Ähnlichkeit von 60,9 % aufwiesen. Innerhalb des Clusters I, dem 125 APEC-Stämme angehörten, lag die interne Übereinstimmung bei über 80 %, innerhalb des

Clusters II sogar bei über 90 %. Daraus lässt sich folgern, dass zur Zeit offensichtlich nur wenige aviäre pathogene *E. coli*-Stämme für Kolibazillose-Ausbrüche verantwortlich sind. Die geringen klonalen Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten lassen sich durch die bereits erwähnte Lokalisation mehrerer Virulenzgene auf einem oder mehreren Plasmiden erklären, durch die der horizontale Gentransfer erleichtert wird. Die Daten unterstreichen einmal mehr die klonale Verbreitung von *E. coli*. Allerdings ist die Tatsache bemerkenswert, dass über einen Zeitraum von 11 Jahren nur so wenige Klone nachweisbar sind. Hier muss auch berücksichtigt werden, dass in Deutschland eine große Hühnerpopulation vorhanden ist - laut Bericht der Zentralen Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH (ZMP), Bonn, vom 31.07.2002 gab es im Dezember 2001 in Deutschland 41,1 Mio. Hennenhaltungsplätze (<http://www.zmp.de/presse/zb/zbko30.pdf>)-, und dass in großen Beständen mehrere 100.000 Tiere auf engem Raum zusammen leben. Deshalb muss von einer hohen Passagerate der APEC ausgegangen werden. Unter diesen Bedingungen wäre das Auftreten einer Vielzahl von Klonen zu erwarten. Offensichtlich herrscht bei APEC jedoch eine strenge Selektion.

Bei der Betrachtung der einzelnen Restriktionsmuster konnten eindeutige Assoziationen zwischen den Serovaren, der regionalen Herkunft und auch der Verteilung der virulenzassoziierten Gene nur in beschränktem Maße festgestellt werden. Bzgl. der Serovare sind lediglich in einer Subgruppe zu 100 % APEC-Isolate des Serovars O78:K80 vorhanden, wobei neun der insgesamt zehn Stämme aus dem Nordwesten stammen. Zudem konnte eine Anhäufung von nicht typisierbaren Stämmen in zwei Subgruppen festgestellt werden, diese stammen aus dem gesamten Bundesgebiet sowie auch aus Betrieben außerhalb Deutschlands. Stämme der O-Gruppe O2 schließlich fanden sich ebenfalls gehäuft in einer Subgruppe, in der alle APEC-Stämme im Nordwesten Deutschlands isoliert worden waren, sowie in Cluster II, in der eine eindeutige regionale Zuordnung nicht getroffen werden kann.

Wesentlich interessanter ist jedoch, dass eine Assoziation zwischen Klonen und regionaler Herkunft lediglich in zwei Gruppen erkennbar ist. Hierbei handelt es sich um Stämme, die zu 100 % im Nordwesten isoliert wurden. Bei der Bewertung dieser Zusammenhänge muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Gruppen mit sechs bzw. sieben APEC-Stämmen nur sehr klein waren. Weiterhin stammten mehr als die Hälfte der untersuchten APEC aus dem Nordwesten. Es ließen sich auch keine weiteren Assoziationen zwischen Restriktionsmuster und regionaler Herkunft erkennen. Das bestätigt die o. g.

Aussage, dass nur eine geringe Anzahl von Klonen über ganz Deutschland verteilt zu sein scheint, was für die Herstellung eines Impfstoffes eine günstige Voraussetzung ist.

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den Restriktionsmustern und der Verteilung der virulenzassoziierten Gene bestand. Auffällig waren hier Subcluster IB und Cluster II, in der die Virulenzgene *fimC*, *iss*, *iucD*, *tsh*, *irp2* und *fyuA* zu jeweils 100 % vorhanden waren. Diese Gene waren ebenfalls überdurchschnittlich häufig in zwei weiteren Subgruppen vorhanden. Auch hier sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die o. g. Genkombination in einem Drittel aller untersuchten APEC-Stämme vorkam. In einer anderen Subgruppe (18 Stämme) kamen die o. g. Gene nur zu einem geringen Anteil vor, in den übrigen Gruppen und Subgruppen fehlte wiederum eine eindeutige Assoziation zwischen Restriktionsmuster und virulenzassoziierten Genen. Leider fehlen in dieser Arbeit genaue klinische sowie pathologische Vorberichte, aus denen hervorgeht, welche klinischen Symptome bei den verendeten Tieren aufgetreten sind, innerhalb welchen Zeitraumes der Tod eingetreten ist und welche pathologischen Veränderungen an den verschiedenen Organen zu erkennen waren. Mithilfe dieser Berichte hätten evtl. stärkere Rückschlüsse auf die Virulenz der jeweiligen Stämme gezogen werden können, so dass man sogar von weniger virulenten Stämmen mit entsprechend geringem Anteil an Virulenzgenen und umgekehrt hätte sprechen können. Hier muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass diese klinischen Vorberichte aufgrund des z. T. perakuten Verlaufs der Kolibazillose und der damit häufig fehlenden klinischen Symptomatik nur schwer bzw. gar nicht gestellt werden können. Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit untersuchten APEC-Stämme von Tieren stammen, die nicht getötet wurden, sondern an Kolibazillose verendet sind, lässt vermuten, dass es sich um stark virulente Stämme handelt.

Um schließlich Aussagen über evtl. Infektketten zwischen verschiedenen Geflügelbeständen treffen zu können, wurden aviäre pathogene *E. coli*-Stämme aus Betrieben, die z. T. miteinander in Kontakt standen (Produktionsbetrieb – Aufzuchtbetrieb) und z. T. ohne jeglichen Kontakt waren, ausgewählt und mit den beschriebenen Methoden untersucht. Sämtliche APEC stammten aus dem Nordwesten Deutschlands.

Bei der Betrachtung der Verteilung der virulenzassoziierten Gene fiel auf, dass die Gene *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh* und *iss* überdurchschnittlich häufig, die Gene *astA*, *hlyE*, *stx2f* und *papC* dagegen gar nicht (im Cluster I) bzw. nur in sehr geringer Anzahl vorhanden waren. Dies scheint auf den ersten Blick nicht weiter verwunderlich, da vor allem im Cluster I

mehrere Gruppen mit bis zu neun Isolaten enthalten sind, die eine 100%-ige Übereinstimmung aufweisen, es sich somit um Klone handelt. Diese Klone stammen jedoch teilweise aus verschiedenen Betrieben, die untereinander Kontakt besitzen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden APEC-Stämme von einem Betrieb in einen anderen eingeschleppt wurden. Die Daten zeigen, dass mit den etablierten Methoden Kausalitäten feststellbar sind.

Ähnliche klonale Analysen wurden bislang lediglich von Chansiripornchai et al., 2001 [21] beschrieben, die insgesamt 50 *E. coli*-Isolate vom Geflügel (davon 35 von an Kolibazillose erkrankten Tieren) mittels „random amplified polymorphic DNA“ (RAPD) - Analysen differenzierten, sowie von Caya et al., 1999 [19] durchgeführt, welche insgesamt 142 aviäre *E. coli*-Isolate und 91 humane *E. coli*-Isolate geno- und phänotypisch miteinander verglichen. Die in dieser Arbeit etablierte Makrorestriktion, mit der insgesamt 150 APEC-Wildtypstämme klonal analysiert wurden, lässt nunmehr Aussagen zur klonalen Verwandtschaft verschiedener APEC-Stämme zu und kann für weitere epidemiologische Studien genutzt werden, um den Ursprung von *E. coli*-Infektionen sowie auch deren Verbreitung festzustellen. So können dauerhaft Maßnahmen getroffen werden, die eine weiträumige Verbreitung der Kolibazillose verhindern.

Neben der Bedeutung für Geflügel gibt es auch Hinweise darauf, dass Stämme der Serovaren O2:K1 und O78:K80 Erreger von Zoonosen sind [2, 22]. Demgegenüber stellten Caya et al., 1999 [19] in einer vergleichenden Untersuchung von aviären *E. coli* und *E. coli*-Isolaten, die aus intra- und extraintestinalen Krankheitsgeschehen von Menschen isoliert wurden fest, dass die aviären Isolate nur wenige Eigenschaften besaßen, die in der Lage sind, entsprechende Erkrankungen beim Menschen zu verursachen. Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass die *E. coli*-Isolate u. a. auf das Vorkommen verschiedener Virulenzfaktoren (CNF1, CNF2, VT1, VT2, Sta, STb, LT, *eae*, *pap*, Hly und Tsh sowie Aerobactin) untersucht wurden, von denen nur drei in der vorliegenden Arbeit in APEC-Isolaten nachgewiesen werden konnten. Allerdings besitzt der Ansatz, lediglich aufgrund von Virulenzfaktoren eine Einschätzung der Virulenz von Bakterien für eine bestimmte Tierspezies zu treffen, nur eingeschränkte Aussagekraft. Um nähere Einblicke darüber zu erhalten, ob APEC-Isolate eine Gefahr für den Menschen darstellen, sollten zukünftig mit Hilfe der hier etablierten Makrorestriktionsanalyse vielmehr die klonalen Verwandtschaften zu humanen Isolaten aus den selben Regionen ermittelt werden. Dies ist insbesondere deshalb

interessant und wichtig, weil die humanen Isolate der Serogruppe O78:K80 vermehrt zu extraintestinalen, septikämischen Infektionskrankheiten beim Menschen führen, die nicht selten einen letalen Ausgang nehmen.

5.1 Schlussfolgerungen

Mit Hilfe dieser Arbeit ist es gelungen, wesentliche und neue Einblicke in das Vorkommen und die Verteilung jener virulenzassoziierten Gene zu erhalten, die prospektive eine Rolle in der Pathogenese der Kolibazillose spielen. In weiterführenden Untersuchungen zur Pathogenese der Kolibazillose kann nun in Infektionsversuchen gezielt die Bedeutung einzelner Virulenzfaktoren geprüft werden. Auf Basis der genotypischen Untersuchung zahlreicher APEC-Stämme mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion konnte weiterhin eine Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion etabliert werden, die dazu dient, *E. coli*-Wildtypstämme innerhalb kürzester Zeit und mit geringem finanziellen Aufwand zu charakterisieren und als aviär pathogen zu identifizieren. Im Gegensatz zur bislang eingesetzten Serotypisierung ermöglicht diese Methode somit erstmals eine eindeutige Differenzierung zwischen apathogenen und pathogenen aviären *E. coli*. Weiterhin lassen sich Aussagen bzgl. der Virulenz der entsprechenden APEC-Isolate treffen, welche z. B. als Grundlage für die Herstellung von Impfstoffen genutzt werden können. Damit könnte die Multiplex-PCR in Zukunft die bislang gebräuchlichste diagnostische Methode der Serotypisierung ersetzen, die aufgrund der o. g. Problematik als unzureichend angesehen werden muss. Durch die Etablierung einer Makrorestriktionsanalyse können schließlich Aussagen zur klonalen Verwandtschaft verschiedener *E. coli*-Isolate getroffen werden. Es lassen sich nunmehr Klone von *E. coli*-Stämmen identifizieren, die überdurchschnittlich häufig beim Geflügel und evtl. sogar auch bei Menschen isoliert werden. Anhand von Infektkettenforschungen können geeignete Maßnahmen zur Verhinderung der Verbreitung der Kolibazillose valide überprüft werden.

Die genotypische Charakterisierung aviärer pathogener *E. coli* ist weiterhin als Ansatz für die Entwicklung neuer und effektiver Kontrollen gegen die APEC-Infektionen zu sehen. Diese sind aus verschiedenen Gründen unerlässlich. Einerseits stellt die Kolibazillose nach wie vor eine Erkrankung dar, die weltweit erhebliche wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie mit sich bringt [10]. Bis zum heutigen Tage existieren jedoch keine Therapiemöglichkeiten oder Impfstoffe, um die Kolibazillose zu bekämpfen bzw. den Ausbruch zu verhindern. Hier stellt sicherlich die fehlende Kenntnis in die Pathogenese den

limitierenden Faktor dar. Gerade auch im Hinblick auf die im März diesen Jahres in Kraft getretenen Verordnung zum Schutz von Legehennen in Käfighaltung („Erste Verordnung zur Änderung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung“ v. 28.02.2002, BGBl. 2002 Teil I Nr. 16) sind geeignete Therapiemöglichkeiten spätestens bis zum Jahre 2007 anzustreben. Laut o. g. Verordnung müssen die Käfige bestimmten Ausstattungskriterien genügen. Zu diesen zählen u. a. Einzelnester und ein Bereich mit Einstreu, die nach jetzigem Wissensstand die Ausbreitung der aviären pathogenen *E. coli* fördern.

Ein weiteres wichtiges und nicht zu unterschätzendes Kriterium der APEC-Isolate ist sicherlich die Tatsache, dass bis heute noch nicht eindeutig geklärt ist, ob es sich bei diesen *E. coli* evtl. um Zooanthroponose-Erreger handelt. Pathogene *E. coli* vor allem der O-Gruppe O78, z. T. auch des Serovars O2:K1, isoliert aus an Septikämie erkrankten Menschen, Geflügel, Rindern, Schafen sowie Schweinen, sind klonal eng miteinander verwandt und stellen damit ein hohes Zooanthroponose-Risiko dar [22].

Um neue und entscheidende Einblicke in die Pathogenese der Kolibazillose des Huhnes zu erhalten, kann das Wissen bzgl. der Verteilung der virulenzassoziierten Gene als gebräuchliches Instrument für weitere umfassendere epidemiologische Studien genutzt werden. Diese Arbeit hat wichtige Grundlagen für anstehende phänotypische Analysen im Rahmen von in vitro- (Zellkultur) sowie in vivo- (Huhn) Infektionsversuchen gelegt.