

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

**Molekulare epidemiologische Untersuchungen von klinischen
Escherichia coli-Isolaten
unterschiedlicher Wirtstierspezies**

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

vorgelegt von
Alexandra Schmidt, geb. Wegener
Tierärztin aus Bad Honnef

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3466

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. Karl-Hans Zessin
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

epidemiology, Escherichia coli infections, uropathogenic Escherichia coli, enteropathogenic Escherichia coli, Shiga toxin-producing Escherichia coli, enterohaemorrhagic Escherichia coli, enterotoxigenic Escherichia coli, urinary tract infections, gastroenteritis, dogs, cats, cattle, pigs, zoonoses, multilocus sequence typing, serotypes, virulence factors

Tag der Promotion: 30.03.2011

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: 978-3-86664-957-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

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 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	9
2. Schrifttum	12
2.1. Pathovaren von <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.1. Übersicht	12
2.1.2. Intestinal pathogene <i>E. coli</i>	15
2.1.2.1. Shiga-Toxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC).....	15
Epidemiologie	15
Klinisches Bild einer STEC-Infektion	16
Virulenzfaktoren.....	17
Shiga-Toxin.....	17
Locus of Enterocyte Effacement (LEE).....	18
Intimin	19
Hitze stabiles Enterotoxin EAST1	19
Enterohämolysin EHEC-Hly.....	20
Extrazelluläre Serin-Protease EspP	20
Pathogenese	20
2.1.2.2. Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	21
Epidemiologie	21
Klinisches Bild einer EPEC-Infektion.....	22
Virulenzfaktoren.....	22
EPEC adherence factor (EAF) Plasmid.....	22
Bundle-Forming Pili (BFP)	23
Locus of Enterocyte Effacement.....	24
EspA-Filamente	24
Pathogenese	24
2.1.2.3. Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	25
Epidemiologie	25
Klinisches Bild einer ETEC-Infektion	26
Virulenzfaktoren.....	27
Hitze labiles Enterotoxin (LT).....	27
Hitze stabiles Enterotoxin (ST)	27
Kolonisationsfaktoren	28
Pathogenese	29
2.1.3. Extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>	30
2.1.3.1. Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC).....	30

Epidemiologie	30
Klinisches Bild einer UPEC-Infektion.....	31
Virulenzfaktoren.....	32
Adhäsine.....	32
P-Fimbrien	33
F1C- und S-Fimbrien	34
Dr-Adhäsine.....	34
Typ 1-Fimbrien.....	35
Toxine	36
Alpha-Hämolysin.....	36
Zytotoxischer Nekrosefaktor (ZNF) 1/2.....	37
Sekretiertes Autotransporter Toxin	38
Eisenakquisitionssysteme.....	38
Aerobaktin.....	39
Serumresistenzfaktoren.....	39
Kapselantigene	40
O-Antigene.....	41
Andere Serumresistenzfaktoren	41
Pathogenese	42
2.2. Verwandtschaftsanalyse	43
2.2.1. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST).....	43
3. Material und Methoden.....	48
3.1. Material.....	48
3.1.1. Bakterienstämme.....	48
3.1.1.1. Verwendete <i>E. coli</i> -Isolate	48
3.1.1.2. Referenz- und Kontrollstämmen	48
3.1.2. Geräte und Labormaterial.....	50
3.1.3. Chemikalien.....	50
3.1.4. Lösungen.....	51
3.1.5. Nährmedien	52
3.1.6. Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation	52
3.2. Methoden	59
3.2.1. Verwendete <i>E. coli</i> -Isolate.....	59
3.2.1.1. Isolierung von <i>E. coli</i>	59
3.2.1.2. Anzucht.....	59
3.2.1.3. Asservierung.....	59
3.2.2. O-Serotypisierung.....	59

3.2.3. Aufreinigung der DNS.....	59
3.2.4. Konzentrationsbestimmung der DNS	60
3.2.5. Polymerase-Kettenreaktion	60
3.2.6. PCR zum Nachweis der Virulenz-assoziierten Gene (VAGe)	61
3.2.7. Agarose-Gelelektrophorese.....	62
3.2.8. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST).....	63
3.2.8.1. Prinzip.....	63
3.2.8.2. Datenbank	63
3.2.8.3. PCR zur Amplifizierung der Genabschnitte für die MLST.....	64
3.2.8.4. Darstellung der Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese	64
3.2.8.5. DNS-Sequenzanalyse	64
3.2.8.6. Computergestützte Analyse der MLST-Daten	65
3.2.9. Statistische Auswertung	65
4. Ergebnisse	66
4.1. O-Serotypisierung	66
4.1.1. O-Serotypen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Kleintier.....	66
4.1.1.1. Vergleich der Serotypen der <i>E. coli</i> -Isolate aus dem GIT und dem UGT	67
4.2. Virulenzgenotypisierung	67
4.2.1. Virulenz-assoziierte Gene der <i>E. coli</i> -Isolate vom Kleintier	67
4.2.1.1. Vergleich der VAGe der <i>E. coli</i> -Isolate aus dem GIT und dem UGT von Hund und Katze	69
4.2.2. Virulenz-assoziierte Gene der <i>E. coli</i> -Isolate vom Schwein	70
4.2.2.1. Vergleich der VAGe der <i>E. coli</i> -Isolate aus dem GIT und dem UGT des Schweins	72
4.2.3. Virulenz-assoziierte Gene der <i>E. coli</i> -Isolate vom Rind	74
4.2.4. Vergleich aller <i>E. coli</i> -Isolate aus dem Gastrointestinaltrakt	76
4.2.5. Vergleich aller <i>E. coli</i> -Isolate aus dem Urogenitaltrakt	79
4.3. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST).....	81
4.3.1 Sequenztypen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Kleintier	82
4.3.1.1. Vergleich der STen der <i>E. coli</i> -Isolate aus dem GIT und dem UGT von Hund und Katze	83
4.3.2. Sequenztypen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Schwein	83
4.3.2.1. Vergleich der STen der <i>E. coli</i> -Isolate aus dem GIT und dem UGT des Schweins	84
4.3.3. Sequenztypen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Rind.....	85
4.3.4. Vergleich aller <i>E. coli</i> -Isolate aus dem Gastrointestinaltrakt	86
4.3.5. Vergleich aller <i>E. coli</i> -Isolate aus dem Urogenitaltrakt	87

4.4. Zusammenhang zwischen O-Serotypen und Virulenz-assoziierten Genen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Kleintier	88
4.5. Zusammenhang zwischen O-Serotypen und Sequenztypen	89
4.5.1. Zusammenhang zwischen O-Serotypen und STen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Kleintier	89
4.6. Zusammenhang zwischen Virulenz-assoziierten Genen und Sequenztypen.....	90
4.6.1. Zusammenhang zwischen VAGen und STen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Kleintier	90
4.6.2. Zusammenhang zwischen VAGen und STen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Schwein ...	92
4.6.3. Zusammenhang zwischen VAGen und STen der <i>E. coli</i> -Isolate vom Rind.....	92
5. Diskussion	93
5.1. Habitatspezifität der Isolate vom Menschen.....	93
5.2. Habitatspezifität und Zoonosepotential der Isolate vom Kleintier	97
5.2.1. Habitatspezifität	102
5.2.2. Zoonosepotential	103
5.3. Habitatspezifität und Zoonosepotential der Isolate vom Schwein	105
5.3.1. Habitatspezifität	106
5.3.2. Zoonosepotential	108
5.4. Habitatspezifität und Zoonosepotential der Isolate vom Rind	111
5.4.1. Habitatspezifität	112
5.4.2. Zoonosepotential	113
5.5. Fazit.....	115
6. Zusammenfassung	117
7. Summary	119
8. Literaturverzeichnis	120
9. Danksagung	149
10. Selbständigkeitserklärung	150

Abkürzungen

ABR	Antibiotikaresistenz
A/E-Läsionen	Attaching and Effacing-Läsionen
APEC	Aviare Pathogene <i>Escherichia coli</i>
BFP	Bundle-Forming Pili
bp	Basenpaar
DAEC	Diffus adhärenente <i>Escherichia coli</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAEC	Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EAF-Plasmid	EPEC adherence factor Plasmid
EDEC	Edema Disease <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	Extraintestinale <i>Escherichia coli</i>
GE	Gastroenteritis
GIT	Gastrointestinaltrakt
Hd	Hund
Hly	Hämolysin
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
InPEC	Intestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
KF	Kolonisierungsfaktor
KT	Kleintier
Kz	Katze
LA	Localized Adherence
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
MMA	Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom
MP-PCR	Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion
MPI	Max Planck Institut
Ms	Mensch
NMEC	Neugeborenen-Meningitis-assoziierte <i>Escherichia coli</i>
PAI	Pathogenitätsinsel
Pap	Pilus assoziiert mit Pyelonephritis

Abkürzungen

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rd	Rind
Sat	Sekretiertes Autotransporter Toxin
SEPEC	Septikämie-assoziierte <i>Escherichia coli</i>
ST	Sequenztyp
STEC	Shiga-Toxin bildende <i>Escherichia coli</i>
STK	Sequenztyp-Komplex
Stx	Shiga-Toxin
Sw	Schwein
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
UGT	Urogenitaltrakt
UGTI	Urogenitaltraktinfektion
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>
VAG	Virulenz-assoziiertes Gen
VF	Virulenzfaktor
ZNF	Zytotoxischer Nekrosefaktor

1. Einleitung

Escherichia (E.) coli ist ein Gramnegatives, gerades, peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium, das mittels Identifizierung seiner somatischen (O-), seiner Kapsel- (K-) sowie seiner Geißel- (H-) Antigene in mehr als 200 Gruppen mit mehreren tausend Serovarianten unterteilt werden kann (Orskov and Orskov 1992). Viele dieser Stämme stellen für ihre Wirte, in deren Dickdarm sie angesiedelt sind, nützliche Kommensalen dar, die unter anderem dessen Immunsystem stärken, seine Verdauung unterstützen, und Vitamin K produzieren (Tenailon, Skurnik et al.) 2010). Einige *E. coli*-Stämme können jedoch Erkrankungen auslösen. Diese Erkrankungen lassen sich grob in solche mit extraintestinaler Symptomatik und solche mit intestinaler Symptomatik unterteilen. Zu ersteren zählen Harnwegs- und Genitaltraktinfektionen, Wundinfektionen, Mastitis, Ödemkrankheit, Sepsis sowie Meningitis bei Neugeborenen, zu letzteren Gastroenteritiden, die zu mildem wässrigen bis hin zu lebensbedrohlichem blutigem Durchfall führen können. Zu den Wirten von *E. coli* gehören Vögel, warmblütige Säugetiere sowie der Mensch.

Die Stämme dieser Arbeit wurden von Rindern, Schweinen, Hunden und Katzen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) bzw. Gastroenteritis (GE) isoliert. Durch die Ermittlung der phylogenetischen Verwandtschaft dieser Stämme, sowie dem Vergleich zwischen den Stämmen der verschiedenen Spezies bzw. Erkrankungen, soll in dieser Arbeit eine eventuell vorhandene Wirts- bzw. Habitatspezifität erkannt werden, und so auch die Bedeutung des Kots der Wirte als Infektionsquelle für ihre eigenen UGT-Infektionen. Durch den Nachweis verschiedener Virulenz-assoziiierter Gene (VAGe) sollen zum einen diese Spezifitäten bestätigt werden, sowie zum anderen das Pathogenitätspotential bestimmter phylogenetischer Gruppen eingeschätzt werden. Schließlich soll, durch Vergleich der gewonnenen Daten mit entsprechenden Daten zu humanen Isolaten gleicher Erkrankungen von der MLST-Datenbank der University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), das Zoonosepotential der Stämme beurteilt werden. Zusätzlich würde die positive Testung von Stämmen aus dem Kot der Tiere auf VAGe, die auf Grund zahlreicher Studien mit humanen UPEC assoziiert werden (Johnson, Kaster et al. 2003; Johnson, Kuskowski et al. 2005; Ewers, Li et al. 2007), diesen als Reservoir für UPEC wahrscheinlich machen.

Für diese Studie wurden von einigen Isolaten die O-Serotypen ermittelt. Da die Isolate dieser Studie jedoch zu unterschiedlichen Zeiten und an unterschiedlichen Orten gewonnen wurden, und die Serotypisierung besser für Ausbruchssituationen geeignet ist, wurde zur Klärung der Verwandtschaft aller 260 Isolate eine Typisierungsmethode angewandt, die auf sehr stabilen Merkmalen beruht, und somit ideal für langzeit-epidemiologische Studien ist.

Bei allen Isolaten wurde die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) angewandt, d.h. der Sequenztyp (ST) für jedes Isolat ermittelt. Die durch die MLST gewonnenen Daten basieren auf eindeutigen Nukleotidsequenzen in den sogenannten „Housekeeping Genen“, sind dadurch laborunabhängig und können weltweit in einer zentralen Datenbank gesammelt werden. Hierdurch war es nicht nur möglich die Stämme dieser Studie untereinander zu vergleichen, sondern auch mit tausenden anderen Isolaten von den verschiedensten Wirten und Erkrankungen. So auch mit Isolaten von Menschen mit Gastroenteritis bzw. Urogenitaltraktinfektion.

Ob ein *E. coli*-Stamm ein Kommensale oder ein Pathogen ist, ist unter anderem abhängig davon ob er Träger bestimmter Gene, sogenannter Virulenz-assoziiierter Gene (VAGe), ist. Diese Gene kodieren unter Anderem für Toxine, Adhäsine, Eisenaquisitionssysteme sowie Serumresistenzfaktoren. Des Weiteren werden pathogene *E. coli*-Stämme zum Teil nach dem Vorhandensein bestimmter VAGe, bzw. nach dem Krankheitsgeschehen von dem sie isoliert wurden, in sogenannte Pathotypen eingeteilt. Die für diese Studie relevanten sind Shiga-Toxin-bildende *E. coli* (STEC), Enteropathogene *E. coli* (EPEC), Enterotoxische *E. coli* (ETEC) und Uropathogene *E. coli* (UPEC) (Tabelle 1). Alle Isolate dieser Studie wurden auf 45 verschiedene Virulenzfaktoren, von denen 34 mit extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) und elf mit durchfallauslösenden *E. coli* (InPEC) assoziiert sind, getestet.

Für viele Phylotypen bzw. Serotypen von *E. coli* ist eine gewisse Wirts- oder Habitatspezifität bekannt. Dies kann bedeuten, dass die entsprechenden Stämme nur einen bestimmten Wirt besiedeln, das heist auch nur innerhalb dieser Wirtsspezies übertragen werden, und hier zu einer Erkrankung führen, oder, dass auch andere Spezies durch diesen Stamm latent infiziert werden und ihm als Reservoir oder zumindest als Überträger dienen. Einige für den Menschen pathogene *E. coli*-Stämme werden von Tieren übertragen und stellen somit ein Zoonoserisiko dar (Blanco, Blanco et al. 1991; Ron 2006; Moulin-Schouleur, Reperant et al. 2007; Smith, Fratamico et al. 2007; Johnson and Taylor 2008; Mora, Lopez et al. 2009).

Ob ein *E. coli*-Stamm virulent ist, hängt aber auch vom Ort der Infektion ab (Habitatspezifität). So können uropathogene *E. coli*-Stämme im Dickdarm ihres Wirtes Kommensale darstellen und erst mit der Übertragung auf dessen Urogenitaltrakt (UGT) ihr pathogenes Potential entfalten (Johnson, Kaster et al. 2003).

Um all diese Infektionsketten bzw. Infektionsquellen nachvollziehen zu können sind epidemiologische Untersuchungen unerlässlich, die die Verwandtschaft verschiedenster Isolate untereinander aufklären. Es stellen sich folgende Fragen:

- Können bestimmte Phylotypen bzw. Serotypen bei den Isolaten einer Wirtstierspezies bzw. einer Erkrankung signifikant häufiger nachgewiesen werden?
- Weisen die Isolate eines bestimmten Phylotypen signifikant mehr mit extraintestinalen Infektionen bzw. Gastroenteritiden assoziierte Gene auf?

- Zeigen sich Verwandtschaften bzw. Ähnlichkeiten in der Verteilung der VAGe zwischen den *E. coli*-Isolaten von Tieren dieser Studie und den humanen Isolaten der MLST-Datenbank bzw. anderer Studien?

2. Schrifttum

2.1. Pathovare von *Escherichia coli*

2.1.1. Übersicht

Escherichia (E.) coli ist ein Pathogen hoher Diversität, das eine große Variabilität in den von ihm ausgelösten Erkrankungen, sowie bei den für dieses Pathogen empfänglichen Wirten aufweist. Auf Grund dieser unterschiedlichen Pathogenität werden folgende Pathovare unterschieden (Nataro and Kaper 1998; Johnson and Russo 2002; Smith, Fratamico et al. 2007):

Darmpathogene *E. coli*:

- STEC Shiga-Toxin-bildende *E. coli*
 (EHEC) (Enterohämorrhagische *E. coli*)
 (EDEC) (Edema Disease *E. coli*)
- EPEC Enteropathogene *E. coli*
- ETEC Enterotoxische *E. coli*
- EIEC Enteroinvasive *E. coli*
- EAEC Enteroaggregative *E. coli*
- DAEC Diffus Adhärente *E. coli*

Extraintestinal pathogene *E. coli*:

- UPEC Uropathogene *E. coli*
- SEPEC Septikämie-assoziierte *E. coli*
- NMEC Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli*
- APEC Aviäre-pathogene *E. coli*

Tabelle 1: Pathotypen von *E. coli* und die von ihnen ausgelösten Symptome bzw. Erkrankungen sowie ihre Besonderheiten

Patho- typ	Wirt				Besonderheiten
	Mensch	Hund / Katze	Schwein	Rind	
Darmpathogene (Durchfallerregende) <i>E. coli</i> (InPEC)					
STEC (EHEC) (EDEC)	hämorrhagische Diarrhö, hämolytisch-urämisches Syndrom der Kinder	wässrige bis hämorrhagische Diarrhö der Welpen	wässrige bis hämorrhagische Diarrhö der Ferkel, Ödemkrankheit	hämorrhagische Diarrhö der Kälber, Reservoir: klinisch gesunde Rinder	LEE und Stx
EPEC	Neugeborenen-Enteritis (Diarrhö)	Jungtierenteritis (Diarrhö)	Jungtierenteritis (Diarrhö)	Jungtierenteritis (Diarrhö)	LEE
ETEC	wässrige Diarrhö	wässrige Diarrhö der Welpen	Colidiarrhö der Ferkel	Colidiarrhö der Kälber	ST und LT
EIEC	hämorrhagische Diarrhö	-	-	-	Invasions-plasmid
EAEC	milde, z.T. chronische wässrige Diarrhö	-	-	-	aggregative Adhäsions-fimbrien (AAFs), spezifische Adhäsion an HEp-2-Zellen

Patho- typen	Wirt				Besonderheiten
	Mensch	Hund / Katze	Schwein	Rind	
DAEC	?	-	-	-	diffuse Adhäsion an HEP-2-Zellen, F1845
Extraintestinalpathogene E. coli (ExPEC)					
UPEC	Urogenitaltrakt- infektion	Urogenitaltrakt- infektion	Urogenitaltrakt- infektion	Urogenitaltrakt- infektion	<i>fim, pap, hly, cnf1</i>
SEPEC	Septikämie	Coliseptikämie der Welpen	Coliseptikämie der Ferkel	Coliseptikämie der Kälber	-
NMEC	Neugeborenen- meningitis	Neugeborenen- meningitis	Neugeborenen- meningitis	Neugeborenen- meningitis	Invasion of brain endothelial cells proteine (<i>ibe</i>)
APEC	?	-	-	-	<i>iss, tsh, sit D</i>
<p>STEC = Shiga-Toxin-bildende <i>E. coli</i> EHEC = Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> EDEC = Edema Disease <i>E. coli</i> EPEC = Enteropathogene <i>E. coli</i> ETEC = Enterotoxische <i>E. coli</i> EIEC = Enteroinvasive <i>E. coli</i> EAEC = Enteroaggregative <i>E. coli</i> DAEC = Diffus Adhärente <i>E. coli</i></p> <p>LEE = Locus of Enterocyte Effacement Stx = Shiga-Toxin ST = Hitze stabiles Enterotoxin LT = Hitze labiles Enterotoxin <i>fim</i> = Typ 1-Fimbrie <i>pap</i> = mit Pyelonephritis assoziierter Pilus <i>hly</i> = Hämolysin <i>cnf1</i> = Zytokrosefaktor 1 <i>iss</i> = increased serum survival <i>tsh</i> = temperatur sensitives Hämagglutinin <i>sit D</i> = <i>Salmonella</i> iron transport system</p>					

In Tabelle 1 findet sich eine Übersicht über die Krankheiten, die diese Pathovare beim Menschen, bei Hund und Katze, beim Schwein sowie beim Rind auslösen.

Da für diese Studie *E. coli*-Stämme aus Durchfallgeschehen bei Hunden, Katzen, Schweinen und Rindern sowie aus Urogenitaltraktinfektionen (UGTI) bei Hunden, Katzen und Schweinen isoliert wurden, sollen die Pathovare STEC, EPEC, ETEC und UPEC im Folgenden näher betrachtet werden.

2.1.2. Intestinal pathogene *E. coli*

2.1.2.1. Shiga-Toxin-bildende *E. coli* (STEC)

Als STEC wird jeder Shiga-Toxin-bildende *E. coli*-Stamm bezeichnet. Das Shiga-Toxin (Stx) wird wegen seiner zytotoxischen Wirkung auf Verorzellen auch als Verotoxin und die *E. coli*-Stämme auch als Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet (Donnenberg and Whittam 2001). Die Bezeichnung EHEC für dieses Pathovar trifft nur für Isolate zu, die von an hämorrhagischer Diarrhö leidenden Menschen isoliert wurden. Bei anderen Wirten spricht man von Shiga-Toxin-bildenden *E. coli* (STEC). EHEC stellen somit eine Untergruppe der STEC dar und besitzen in der Regel einen „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) (Elliott, Sperandio et al. 2000). Eine weitere Untergruppe der STEC sind die Erreger der Ödemkrankheit der Schweine (EDEC). Diese Stämme produzieren eine Stx 2e (e = edema) genannte Variante des Shiga-Toxins (Moxley 2000).

Epidemiologie

Wiederkäuer stellen weltweit das Hauptreservoir von STEC dar (Griffin and Tauxe 1991). Adulte Wiederkäuer sind häufig persistent infiziert, erkranken aber in der Regel nicht. Bei **Kälbern** kann es hingegen wie beim Menschen zu einer hämorrhagischen Diarrhö kommen (Cray and Moon 1995). Es wurden zahlreiche Studien zur Prävalenz der STEC in Wiederkäuern durchgeführt, deren Ergebnisse sehr unterschiedlich sind. Zum Teil konnten Prävalenzen von über 50 % ermittelt werden (Hussein 2007). Die meisten Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass 4-18,2 % aller Rinder Träger pathogener STEC sind (Coia 1998; Wieler, Sobjinski et al. 2007). Für **Schwein, Hund und Katze** gibt es hierzu sehr wenige Daten. Die Prävalenz beim Schwein betrug in zwei Studien 7,5 (Beutin, Geier et al. 1993) bzw. 11,3 % (Cobeljic, Dimic et al. 2005), bei der Katze wurde eine Prävalenz von 13,8 % festgestellt (Beutin, Geier et al. 1993) und beim Hund von 4,8 (Beutin, Geier et al. 1993) bzw. 28 % bei an Durchfall leidenden Tieren (Sancak, Rutgers et al. 2004). Die

Übertragung erfolgt meist über kontaminierte Nahrung, insbesondere rohes Rindfleisch und Milch oder Wasser (Karmali 2004), ist jedoch auch von Tier zu Tier bzw. zu Mensch möglich. Seit 1998 besteht eine Meldepflicht bei Verdacht auf eine EHEC-Infektion beim Menschen. Seitdem wurden dem Robert Koch Institut ca. 1000 Fälle jährlich gemeldet (Karch, Mellmann et al. 2009).

Klinisches Bild einer STEC-Infektion

Eine STEC-Infektion beginnt beim **Menschen** in der Regel mit wässrigem Durchfall, meist begleitet von Bauchschmerzen sowie Übelkeit und Erbrechen. Fieber tritt selten auf. Innerhalb von ein bis zwei Tagen kann der Durchfall blutig werden. Meist bleiben die Beschwerden auf den Magen-Darmtrakt beschränkt, jedoch in 5-10 % der Fälle entwickeln Patienten unter fünf Jahren ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) (Verweyen, Karch et al. 2000), welches einen Symptomenkomplex aus akutem Nierenversagen, hämolytischer Anämie und vermutlich einer Thrombozytopenie darstellt. Verantwortlich hierfür ist das von den STEC gebildete und in das Blut gelangte Shiga-Toxin, das die Intima der Gefäße schädigt. Bei den vom HUS betroffenen Patienten handelt es sich meist um Kinder sowie immunsupprimierte Menschen (Karmali 1989; van de Kar, Roelofs et al. 1996). Ein Reservoir für *E. coli*-Stämme (EHEC), die fähig sind diese Erkrankung auszulösen, stellen klinisch gesunde Rinder dar (Johnson and Taylor 2008).

Bei jüngeren **Kälbern** können STEC-Stämme hämorrhagischen Durchfall hervorrufen, jedoch sind bei diesen nur wenige Tage alten Kälbern meist weitere Durchfallerreger, hauptsächlich Rota- und Coronaviren sowie Kryptosporidien, an der Erkrankung beteiligt (Wray, McLaren et al. 1989; Sandhu and Gyles 2002).

Eine katarrhalische bis hämorrhagische Diarrhö durch STEC tritt bei **Ferkeln** meist nach dem Absetzen auf und wird daher auch als „Postweaning *E. coli*-Enteritis“ bezeichnet (Nabuurs 1991; Amezcua, Friendship et al. 2002; Fairbrother, Nadeau et al. 2005). Sie betrifft meist mehrere Ferkel einer Gruppe. Bei einigen Absetzferkeln und Läufer Schweinen führen EHEC zur Entstehung der Ödemkrankheit. Durch die in dieser Phase meist stattfindende Futterumstellung sowie Umstallung der Tiere, können sich EHEC im Darm massenhaft vermehren und Shiga-Toxin (Stx 2e) produzieren, das in den Blutkreislauf gelangt und schließlich durch Schädigung der Gefäße zur Bildung von Ödemen führt. Die Ödemkrankheit führt meist zum schnellen Tod, bei längerem Verlauf zu zentralnervösen Störungen, die auf die, aus der Gefäßschädigung resultierende, Hypoxie des Nervengewebes zurückzuführen sind (Gannon and Gyles 1990; Cornick, Matise et al. 1999; Moxley 2000).

Bei **Hunden** und **Katzen** stehen STEC selten im Zusammenhang mit Durchfällen (Bentancor 2006). Da STEC sowohl im Darm gesunder als auch im Darm an Diarrhö leidender Hunde und Katzen gefunden wurden, ist noch nicht abschließend geklärt, ob STEC überhaupt ein pathogenetisches Potential für Hunde und Katzen haben (Smith, Kruth et al. 1998; Beutin 1999; Bentancor, Rumi et al. 2007).

Virulenzfaktoren

Shiga-Toxin

Die Shiga-Toxin-Familie beinhaltet zwei große Gruppen von Toxinen, Shiga-Toxin 1 und 2 (Stx 1 und Stx 2). Das Stx 2 kommt in fünf unterschiedlichen Formen vor (Stx 2 und Stx 2c bis Stx 2f). STEC-Stämme exprimieren eines oder mehrere der Toxine. Das Stx 1 der STEC ist identisch mit dem Toxin von *Shigella dysenteriae* (Stx) (O'Brien and Holmes 1987).

Die Stx-Gene sind Teile des Genoms temperenter Lambda-Phagen (O'Brien, Marques et al. 1989; Neely and Friedman 1998; Muniesa, Recktenwald et al. 2000; Teel, Melton-Celsa et al. 2002). Dies sind Bakteriophagen, für die *E. coli* den Wirt darstellt, und deren Genom bevorzugt in definierte Positionen des Wirtschromosoms integriert wird. Integriert werden hierbei auch Regulatorgene, die entscheidend sind für die Produktion des Toxins (Muniesa, de Simon et al. 2003). Durch diese Phagen ist ein horizontaler Gentransfer zwischen verschiedenen *E. coli*-Stämmen möglich (Acheson, Reidl et al. 1998; Schmidt, Bielaszewska et al. 1999), was möglicherweise dazu führen kann, dass sich aus nicht Shiga-Toxin produzierenden *E. coli*-Stämmen STEC entwickeln (Muniesa, de Simon et al. 2003).

Die Shiga-Toxine binden bevorzugt an Globotriaosylceramid (Gb3) auf der Wirtszelloberfläche, eine Ausnahme stellt das von EDEC gebildete Stx 2e dar, welches Globotetraosylceramid (Gb4) als Rezeptor erkennt (DeGrandis, Law et al. 1989; Weinstein, Jackson et al. 1989; Samuel, Perera et al. 1990). Die Empfindlichkeit eines bestimmten Zelltyps gegenüber Stx scheint von der Anzahl dieser Toxin-Rezeptoren auf dessen Oberfläche abhängig zu sein (Jacewicz, Mobassaleh et al. 1994). Beim Menschen tragen vor allem die Endothelzellen der Niere sowie die Darmepithelzellen Gb3.

Alle Stx bestehen aus einer A-Untereinheit und einem Pentamer aus identischen B-Untereinheiten. Die B-Untereinheiten vermitteln die spezifische Bindung des Toxins an Gb3 bzw. Gb4, wohingegen die A-Untereinheit eine N-Glykosidase darstellt, die, nachdem sie in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert wurde, einen Adeninrest der 28S-rRNS der eukaryontischen Zelle hydrolytisch entfernt. Durch diese Veränderung wird die Bindung der tRNA an die Ribosomen verhindert und damit die Proteinsynthese der Zelle inhibiert. Dies führt zum Tod der Zelle (Endo, Tsurugi et al. 1988).

Die Produktion des Stx ist essentiell für die Entstehung einer hämorrhagischen Diarrhö. Ohne Stx, also z.B. nur durch die Ausbildung der sog. „Attaching and Effacing“-Läsionen (A/E-Läsionen), entwickelt sich in der Regel lediglich ein katarrhalischer Durchfall.

Locus of Enterocyte Effacement (LEE)

Die Fähigkeit von STEC, ebenso wie die von EPEC, A/E-Läsionen hervorzurufen, ist verbunden mit einer großen, chromosomalen Pathogenitätsinsel (PAI) namens LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (McDaniel and Kaper 1997; Celli, Deng et al. 2000; Chen and Frankel 2005; Dean, Maresca et al. 2005; Mellies, Barron et al. 2007). Der LEE ist in fünf Operons (*LEE1* bis *LEE5*) organisiert (Jelcic, Hufner et al. 2008). Alle für die Entstehung von A/E-Läsionen essentiellen Gene sind auf dem LEE lokalisiert:

- *esp* *E. coli*-secreted protein (*LEE4*)
- *esc* *E. coli* secretion (*LEE1* bis 3)
- *sep* secretion of *E. coli* proteins
- *eae* *E. coli* attaching and effacing (Intimin) (*LEE5*)
- *tir* translocated intimin receptor (*LEE5*)

Die Gene *esc* und *sep* kodieren für ein Typ-III-Sekretionssystem. Dieses Sekretionssystem stellt einen Mechanismus dar, der die Translokation von pathogenen Proteinen durch die Zellwand in das Zytoplasma eukaryontischer Zellen vermittelt. Die sekretierten Proteine werden durch einen Multiprotein-Komplex, der einen kontinuierlichen Kanal durch die Zellmembran des Bakteriums, das Periplasma und die angrenzende Zellwand der eukaryontischen Zelle bildet, in die Zelle injiziert. Zu diesen translozierten Proteinen gehören einige der Esp-Proteine (*EspF*, *EspG* und eventuell *EspB* (Tacket, Sztein et al. 2000)) sowie der Intimin-Rezeptor Tir (Kenny and Finlay 1995). *EspF* scheint eine Rolle in der Permeabilitätssteigerung der Tight Junctions des Darmepithels zu spielen (McNamara, Koutsouris et al. 2001). Da der Verlust des *espG*-Gens zu einer verringerten intestinalen Kolonisierung führt, scheint *EspG* ebenfalls zur Virulenz der STEC beizutragen (Elliott, Krejany et al. 2001). Nachdem Tir in das Zytoplasma des Enterozyten transloziert und dort phosphoryliert wurde, wird es in dessen Zellmembran integriert und dient anschließend dem Protein Intimin in der Außenmembran des Bakteriums als Rezeptor. Hierdurch erfolgt eine feste Bindung zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle (Attachment). Durch Intimin und Tir sowie einige translozierte Proteine kommt es durch eine Umstrukturierung des Aktingerüsts der Zelle zu charakteristischen bis zu 10 µm großen Podesten unterhalb der Bakterien und einem Verlust der Mikrovilli-Struktur (Effacement) des Enterozyten

(Rosenshine, Ruschkowski et al. 1996). Hierdurch wird die Kolonisierung der Wirtszelloberfläche begünstigt (Goosney, Knoechel et al. 1999).

Die LEE-PAI beinhaltet einen Mechanismus zur Mobilisierung und Integration, welcher den horizontalen Transfer zwischen verschiedenen *E. coli*-Stämmen ermöglicht (Tauschek, Strugnell et al. 2002).

Intimin

Intimin ist ein Adhäsionsprotein in der äußeren Membran von STEC und EPEC (Jerse and Kaper 1991), das die Bindung an die Enterozyten innerhalb der A/E-Läsionen vermittelt. Intimin wird kodiert durch das *eae*-Gen (*E. coli* attaching and effacing), welches einen Teil des LEE darstellt (Frohlicher, Krause et al. 2008) und essentiell für die Ausbildung der A/E-Läsionen ist (Rosenshine, Ruschkowski et al. 1996). Als Rezeptor dient der durch *E. coli* gebildete Tir nach Einbau in die Wirtszellmembran (Hartland, Batchelor et al. 1999). Dieser fungiert anschließend als Ausgangspunkt für die Reorganisation des Aktins bei der Podestbildung.

Intimin zeigt eine starke Ähnlichkeit zum Invasin-Protein von *Yersinia pseudotuberculosis* (Donnenberg and Kaper 1991). Es konnten bisher mindestens zehn verschiedene Typen von Intimin identifiziert werden (Agin and Wolf 1997; Adu-Bobie, Frankel et al. 1998; Oswald, Schmidt et al. 2000; Zhang, Kohler et al. 2002), welche nicht nur eine gewisse Wirtsspezifität, sondern auch eine Gewebespezifität zu vermitteln scheinen.

Hitzestabiles Enterotoxin EAST1

Bei diesem Toxin handelt es sich um ein Enterotoxin bestehend aus 39 Aminosäuren, das erstmals in EAEC entdeckt wurde und Ähnlichkeiten zu dem hitzestabilen Enterotoxin 1 der ETEC aufweist (Savarino, Fasano et al. 1991; Savarino, Fasano et al. 1993). Kodiert wird es durch *astA*, welches in vielen STEC, aber auch in anderen, nicht nur intestinal pathogenen *E. coli*-Pathovaren nachgewiesen wurde (Savarino, McVeigh et al. 1996). Auf Grund seiner Ähnlichkeit zu dem hitzestabilen Enterotoxin 1 ist davon auszugehen, dass das EAST1 wie dieses zu einer Aktivierung der Guanylatzyklase führt (Savarino, Fasano et al. 1993) (siehe unten). Es wird angenommen, dass es zur Entstehung der katarrhalischen Diarrhö, die zu Beginn einer STEC-Infektion meistens vorherrscht, beiträgt.

Enterohämolysin EHEC-Hly

Dieses Hämolysin unterscheidet sich von dem häufig mit UPEC assoziierten Hämolysin HlyA und konnte bei einem hohen Anteil der STEC nachgewiesen werden (Beutin, Montenegro et al. 1989). Schmidt et al. konnten mittels einer PCR das für EHEC-Hly kodierende Gen in der Mehrzahl der getesteten STEC-Stämme nachweisen, in anderen Diarrhö-assoziierten *E. coli* hingegen nicht (Schmidt, Beutin et al. 1995). Folglich scheint es eine Assoziation zwischen Stx und EHEC-Hly zu geben. Die Rolle, die dieses Hämolysin in der Pathogenese einer STEC-Infektion spielt, ist noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit wäre, dass das durch EHEC-Hly freigesetzte Hämoglobin als Eisenquelle für die STEC dient und somit ihr Wachstum fördert (Law and Kelly 1995).

Extrazelluläre Serin-Protease EspP

Die EspP ist durch das episomal kodierte Gen *espP* kodiert und stellt einen weiteren möglichen Virulenzfaktor der STEC dar. EspP spaltet Pepsin sowie den humanen Blutgerinnungsfaktor V, wodurch es zu einer Hemmung der Blutgerinnung kommt, was zu einer Verschlimmerung der hämorrhagischen Diarrhö beitragen könnte (Brunner, Schmidt et al. 1997).

Pathogenese

Nach oraler Aufnahme gelangen die säuretoleranten STEC in den unteren Gastrointestinaltrakt, um diesen anschließend zu kolonisieren. Nach initialer Bindung bilden die Bakterien das Typ III- Sekretionsystem aus, welches über die Einschleusung des Tir in die Wirtszelle eine feste Bindung zwischen dieser und dem Bakterium mittels Intimin-Tir-Interaktion vermittelt. Die STEC nutzen nun Komponenten des Zytoskeletts der Wirtszelle und bewirken eine Aktinakkumulation, die zur Ausbildung so genannter Podeste in den Enterozyten unterhalb der Stelle, an der sich die Erreger angelagert haben, führt. Durch die Ausbildung dieser Podeste wird die Bindung der Bakterien untereinander sowie an der Darmzelle erleichtert. Zudem führt sie zum Verlust der Mikrovillstruktur, wodurch es zur Malabsorption kommt. Nach der Adhärenz der STEC kommt es im Zytosol der Wirtszelle zur Phosphorylierung verschiedener Kinasen, wodurch diese aktiviert werden. Dies führt zu einer verstärkten Elektrolytsekretion (Collington, Booth et al. 1998), der auf Grund des osmotischen Drucks Wasser ins Darmlumen folgt. Zusätzlich führt die Infektion mit STEC dazu, dass die interzellulären Tight Junctions durchlässiger werden (Canil, Rosenshine et al. 1993; Spitz, Yuhan et al. 1995). Die zu Beginn einer STEC-Infektion auftretende

katarrhalische Diarrhö resultiert wohl aus einer Kombination der oben erwähnten Erscheinungen.

Die im Darm des Wirtes in der Regel niedrige Konzentration an Eisenionen dient den Bakterien wahrscheinlich als Auslöser zur Expression von Virulenz-assoziierten Genen (VAGen) (Calderwood and Mekalanos 1987) und damit auch der Produktion des Stx. Das in die Umgebung abgegebene Stx wird rezeptorvermittelt in die Enterozyten internalisiert. In den abgespaltenen Vesikeln wird es zum endoplasmatischen Retikulum transportiert. Hier kommt es zur Abspaltung der enzymatisch aktiven A1-Untereinheit, die nach Ausschleusung ins Zytosol über den oben beschriebenen Mechanismus zur Hemmung der Proteinsynthese und letztendlich zum Tod der Wirtszelle führt. Die Folge hiervon sind Läsionen im Darmepithel und schließlich eine hämorrhagische Diarrhö.

Beim Menschen sowie beim Schwein kann es über die Vesikel jedoch auch zu einer Translokation des Stx durch die Epithelzelle auf die basale Seite und von hier weiter in den Blutkreislauf des Wirtes kommen (Sandvig and van Deurs 1996). Nach Bindung des Toxins an Gb4-Rezeptoren des Endothels verschiedener Organe kann dies zur Ausprägung des HUS beim Menschen bzw. der Ödemkrankheit beim Schwein führen.

2.1.2.2. Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

Die offizielle Definition für EPEC nach einem internationalen Symposium in São Paulo 1995 lautet: „*Escherichia coli*, die an Darmzellen die charakteristischen A/E-Läsionen bilden und kein Shiga-Toxin bilden. Weiterhin wird unterschieden zwischen „typischen“ und „atypischen EPEC“. Erstere besitzen ein so genanntes „EPEC Adherence Factor (EAF)-Plasmid“, das unter Anderem Gene trägt, die für die „Bundle-Forming Pili (BFP)“ kodieren, letztere sind durch das Fehlen eines solchen Plasmides definiert (Trabulsi, Keller et al. 2002).

Epidemiologie

Typische EPEC wurden bisher nur vom **Menschen** isoliert (Nataro and Kaper 1998; Ishii, Meyer et al. 2007), daher scheinen Menschen, und hier besonders latent infizierte Erwachsene, das einzige lebende Reservoir für diese Organismen zu sein (Trabulsi, Keller et al. 2002). Wieler et al. konnten in über 1200 Kotproben von 221 Kälbern keine typischen EPEC nachweisen (Wieler, Sobjinski et al. 2007). Dagegen kommen atypische EPEC in verschiedenen tierischen Wirten vor. Es gibt bisher sehr wenige Studien über die Prävalenz dieser Erreger in Tieren. In einer Studie wurden im Kot von 2,7 % der getesteten **Kälber** (n =

546) EPEC gefunden (Aidar-Ugrinovich, Blanco et al. 2007). In einer anderen Studie konnten aus 13 % von an Diarrhö erkrankten **Hunden** und aus 8,3 % von gesunden Hunden EPEC isoliert werden (Nakazato, Gyles et al. 2004). Weiter bestimmten Ishii et al. die EPEC-Prävalenz in vielen verschiedenen Wirten und ermittelten für **Katzen, Rinder** und **Schweine** jeweils ca. 2,5 sowie für **Hunde** ca. 4 % (Ishii, Meyer et al. 2007). EPEC gehören zu den wichtigsten Erregern persistierender Durchfälle bei Kindern in Entwicklungsländern (je nach Studie und angewandter Diagnosemethode liegen die Prävalenzen zwischen 5 und 20 % (Ochoa, Barletta et al. 2008)), und ihre Prävalenz in den Industrieländern nimmt stetig zu. Wichtig, insbesondere in Bezug auf das Zoonoserisiko, ist dabei zu erwähnen, dass atypische EPEC, die höchstwahrscheinlich nur von Mensch zu Mensch übertragen werden, mittlerweile weltweit die größte Rolle spielen (Trabulsi, Keller et al. 2002). Diese waren in den oben erwähnten Studien für 78 % aller EPEC-Infektionen bei Kindern unter fünf Jahren verantwortlich (Ochoa, Barletta et al. 2008).

Klinisches Bild einer EPEC-Infektion

Beim **Menschen** sind EPEC die Erreger der klassischen Säuglingsdiarrhö. Zur Auslösung der Erkrankung ist nur eine sehr geringe Infektionsdosis nötig. Die Säuglinge leiden an einem wässrigen Durchfall und können schnell dehydrieren, was in Entwicklungsländern mit schlechter medizinischer und hygienischer Versorgung zu einer Mortalität von bis zu 50% führt. Im Stuhl befindet sich meist kein Blut. In einigen Fällen wird die Diarrhö von Fieber begleitet. Obwohl der Durchfall in der Regel nach 5-15 Tagen aufhört, kann er jedoch auch chronisch werden (Levine 1987).

Bei **Rindern, Schweinen, Hunden** und **Katzen** sind typische EPEC in der Regel nur für Jungtiere virulent und rufen bei diesen ebenfalls Durchfälle ohne Blutbeimengungen hervor.

Virulenzfaktoren

EPEC adherence factor (EAF) Plasmid

Der Besitz eines EAF-Plasmids befähigt die Bakterien Mikrokolonien auf der Oberfläche des Darmepithels zu bilden, die auf Grund ihrer typischen Morphologie „Localized Adherence (LA)“ genannt werden (Baldini, Kaper et al. 1983; Donnenberg, Giron et al. 1992; Bieber, Ramer et al. 1998). Die Größe dieses Plasmids variiert zwischen 85 und 110 kb, weshalb anzunehmen ist, dass auch die enthaltenen Gene zum Teil variieren (Nataro, Scaletsky et al. 1985). Dennoch zeigt die für die BFP kodierende Region eine hoch konservierte Sequenz

(Nataro, Maher et al. 1987). Die BFP stellen Typ IV-Fimbrien dar, deren Expression abhängig ist von einem Operon bestehend aus 14 Genen, inklusive dem *bfpA*-Gen, das für die große strukturelle Untereinheit „Bundlin“ kodiert (Stone, Zhang et al. 1996). Die meisten dieser Gene sind essentiell für die Synthese der BFP (Bieber, Ramer et al. 1998; Anantha, Stone et al. 2000). Ein weiterer zur Virulenz von EPEC beitragender, auf dem Plasmid lokalisierter Faktor stellt der „Plasmid-Encoded Regulator“ (Per), bestehend aus den Genen *perA*, *perB* und *perC*, dar. Per aktiviert Gene innerhalb des *bfp*-Operons und des LEE (Tobe, Schoolnik et al. 1996; Mellies, Elliott et al. 1999; Elliott, Sperandio et al. 2000).

Bundle-Forming Pili (BFP)

Die BFP sind aufgebaut aus dem Monomer Bundlin, mehrere Monomere bilden einzelne Stränge, die wiederum zu einer Tripelhelix verbunden sind (Ramboarina, Fernandes et al. 2005), die 50-500 nm breit sowie 14 bis 20 µm lang ist (Clarke, Haigh et al. 2003). Verankert sind die Pili in der inneren Membran des Bakteriums durch eine hydrophobe Domäne. Diese Typ IV-Fimbrien zeigen einige Ähnlichkeiten zu denen anderer pathogener Bakterienspezies (Stone, Zhang et al. 1996; Giron, Gomez-Duarte et al. 1997). Ein spezifischer Rezeptor für die BFP konnte bisher nicht identifiziert werden, jedoch wurde eine Bindung an das Lipid Phosphatidylethanolamin festgestellt, welche sowohl die Adhärenz an die Wirtszelle als auch die Verbindung der Bakterien untereinander vermitteln könnte (Khursigara, Abul-Milh et al. 2001). Die Pili werden am stärksten exprimiert in der exponentiellen Wachstumsphase bei 37°C, in der Gegenwart von Kalzium und der Abwesenheit von Ammonium. Diese Konditionen finden sich im Dünndarm des Wirtes, nicht jedoch im Dickdarm oder in der äußeren Umwelt (Vuopio-Varkila and Schoolnik 1991; Puente, Bieber et al. 1996).

Die BFP tragen zur vollen Entfaltung der EPEC-Virulenz bei, da sie die initiale lokalisierte Bindung (LA) an den Enterozyten des Wirtes sowie die Autoaggregation der Bakterienkolonien vermitteln (Bieber, Ramer et al. 1998; Ramboarina, Fernandes et al. 2005; Saldana, Erdem et al. 2009). Dennoch sind sie für die Adhäsion an die Enterozyten nicht essentiell. Atypische EPEC, welche BFP-negativ jedoch Intimin-positiv sind, adhären und führen ebenfalls zur Ausbildung der A/E-Läsionen. Die entstehenden Kolonien sind jedoch kleiner und es fehlt ihnen die dreidimensionale Struktur (Hicks, Frankel et al. 1998).

In die Adhärenz der EPEC scheinen auch deren Flagellen, die durch das *fliC*-Gen kodiert werden, involviert zu sein. *fliC*-Mutanten zeigten im Zellversuch eine deutlich geringere Fähigkeit zur Adhäsion sowie zur Bildung von Mikrokolonien (Giron, Torres et al. 2002).

Locus of Enterocyte Effacement

EPEC bilden genauso wie STEC A/E-Läsionen, welche durch den gleichen LEE-kodierten Mechanismus vermittelt werden (Badea, Beatson et al. 2009). Bei einem Vergleich des LEE von EPEC mit dem von STEC waren die Gene des LEE hoch konserviert, besonders die des Typ III-Sekretionssystems. Lediglich die Effektorproteine zeigten eine etwas höhere Variabilität (Muller, Benz et al. 2009).

EspA-Filamente

Ein wesentlicher extrazellulärer Bestandteil des innerhalb des LEE kodierten filamentösen Typ-III-Sekretionssystems ist EspA. Es bildet einen langen flexiblen, ca. 12 nm breiten helikalen Kanal zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle und ist in seiner Struktur dem Flagellen-Filament sehr ähnlich (Crepin, Martinez et al. 2008). EspA interagiert jedoch auch direkt mit der Wirtszelloberfläche während der frühen Phase der Entstehung einer A/E-Läsion (Knutton, Rosenshine et al. 1998). Daher könnte es besonders bei atypischen EPEC, denen ein EAF-Plasmid fehlt, eine Rolle in der initialen Bindung der Erreger an den Enterozyten spielen. Dies konnte durch Zelladhäsionsversuche mit *espA*-Mutanten bestätigt werden (Cleary, Lai et al. 2004). Die durch EspA vermittelte Bindung scheint jedoch weniger effizient zu sein als die durch BFP vermittelte, was dadurch begründet sein könnte, dass jedes Bakterium im Durchschnitt nur 12 EspA-Filamente ausbildet (Daniell, Takahashi et al. 2001).

Pathogenese

Es wurde ein Drei-Stufen-Modell für die Pathogenese von EPEC entwickelt (Donnenberg and Kaper 1992).

1. Initiale Adhäsion an die Wirtszelle
2. Produktion und Translokation bakterieller Proteine in die Wirtszelle durch das Typ-III-Sekretionssystem
3. Enge Bindung des Bakteriums mit Podestbildung

Der erste Schritt in der Kolonisierung des Darms durch typische EPEC ist deren Bildung von einzelnen Mikrokolonien in dem Muster der „Localized Adherence“. Dieser Schritt ist abhängig von der Anwesenheit des EAF-Plamids und entfällt daher für atypische EPEC. Diese vermitteln ihre initiale Bindung über andere Adhäsionsproteine, u.a. EspA, binden jedoch nicht untereinander und es entsteht keine dreidimensionale Koloniestruktur wie bei den BFP-tragenden EPEC.

Die zweite und dritte Stufe in der Pathogenese der EPEC entspricht der Pathogenese der STEC, mit Ausnahme der Produktion und Sekretion des Shiga-Toxins, daher bleibt eine blutige Diarrhö bei einer EPEC-Infektion in der Regel aus. Es entstehen ebenfalls A/E-Läsionen, in deren Folge es zur Malabsorption durch Verlust der Mikrovilli, zur Elektrolytsekretion und zur Störung der Tight Junctions kommt.

2.1.2.3. Enterotoxische *E. coli* (ETEC)

Die Definition für ETEC lautet: *E. coli*-Stämme, welche mindestens ein Mitglied der zwei Enterotoxingruppen, Hitzestabile und Hitzelabile Enterotoxine (ST und LT) produzieren (Levine 1987). 46% der ETEC produzieren ausschließlich ST, 25% LT sowie 29% beide Toxine (Wolf 1997). Ein weiteres typisches, jedoch nicht zwingendes Merkmal der ETEC ist die durch die Adhäsine vermittelte Adhäsion an den Darmepithelzellen. Einige der wichtigsten dieser Virulenzfaktoren stellen die Fimbrien F4, F5, F6, F17, F18 sowie F41 dar. Diese sind zum Teil auch wirtsspezifisch (Van den Broeck, Cox et al. 2000; Nagy and Fekete 2005).

Epidemiologie

Da die meisten Menschen und Tiere nach einer überstandenen ETEC-Infektion eine Immunität gegenüber diesen Erregern entwickeln und immune, asymptomatisch infizierte Individuen ETEC in großer Zahl über ihren Kot ausscheiden, ist die Umgebung in für ETEC endemischen Gebieten häufig mit diesen kontaminiert (DuPont, Formal et al. 1971), so dass Jungtiere bzw. Säuglinge in diesen Gebieten meist auch mit ETEC in Kontakt kommen. Hieraus resultieren Prävalenzen von durch ETEC ausgelösten Durchfällen von 10-30% bei **Kindern** (Levine, Ferreccio et al. 1993; Mangia, Duarte et al. 1993; Flores-Abuxapqui, Suarez-Itoil et al. 1994; Hoque, Faruque et al. 1994; Schultz, Pool et al. 1994; Tornieporth, John et al. 1995), 0-16% bei **Kälbern** (Krogh 1983; Sherwood, Snodgrass et al. 1983; Bellinzoni, Blackhall et al. 1990; Blanco, Blanco et al. 1993), 17,5-26% bei **Ferkeln** (Wieler, Ilieff et al. 2001; Lee, Kang et al. 2008) und 4-26% bei **Welpen** (Olson, Hedhammar et al. 1985; Hammermueller, Kruth et al. 1995). Die Erkrankungsrate sinkt mit zunehmendem Alter (Qadri, Svennerholm et al. 2005). Besonders hohe Prävalenzen treten im Zusammenhang mit schlechten hygienischen Bedingungen auf, auf Grund derer Lebensmittel und Wasser immer wieder durch Kot kontaminiert werden. Dies trifft insbesondere auf Entwicklungsländer zu. Weltweit resultieren jährlich geschätzte 650 Millionen Fälle von Durchfall sowie 380.000

Todesfälle von Kindern unter fünf Jahren aus ETEC-Infektionen (Sizemore, Roland et al. 2004).

Klinisches Bild einer ETEC-Infektion

ETEC verursachen bei **Säuglingen, Kindern und Erwachsenen** eine choleraähnliche Durchfallerkrankung. In der Regel kommt es zu plötzlichem, massivem wässrigen Durchfall, der bei immunkompetenten Erwachsenen selbstlimitierend ist und nach drei bis vier Tagen vorbei ist, jedoch bei Säuglingen durch die starke Dehydratation und den Elektrolytverlust häufig letal verläuft. Begleitet wird dieser Durchfall häufig durch Erbrechen. Durch den fortschreitenden Flüssigkeitsverlust kommt es zu Mundtrockenheit, erhöhtem Puls, Lethargie, herabgesetztem Hautturgor, gesenkten Blutdruck sowie Muskelkrämpfen (Qadri, Svennerholm et al. 2005). Fieber bleibt in der Regel aus. Bei Erwachsenen steht die massenhafte Vermehrung der Erreger im Darm meist mit prädisponierenden Faktoren, wie Milieu-, Diät- oder Klimawechsel in Zusammenhang und wird daher in einigen Fällen auch als Reisediarrhö bezeichnet, die zu 20 bis 50 % durch ETEC verursacht wird (Sizemore, Roland et al. 2004; Qadri, Svennerholm et al. 2005; Okoh and Osode 2008). Bei einer adäquaten Behandlung, insbesondere einem Ausgleich des Wasser- und Elektrolytverlustes, ist die Mortalität sehr niedrig (< 1 %) (Qadri, Svennerholm et al. 2005).

Die Coliruhr der **Kälber** tritt in der ersten Lebenswoche auf und ist geprägt von einer wässrigen, grau-gelben Diarrhö, die auch Blutbeimengungen enthalten kann und zum Teil von Fieber begleitet wird. In Folge des erheblichen Wasser- und Elektrolytverlustes kommt es zu Exsikkose mit Azidose. Bei akutem Verlauf beträgt die Krankheitsdauer drei bis sechs Tage. Die Letalität kann hoch sein (Nagy and Fekete 2005).

Bei **Schweinen** können sowohl Saug- als auch Absatzferkel von der Coliruhr betroffen sein. Es kommt ebenfalls zu einer wässrigen Diarrhö und folgender Dehydratation, die ohne Behandlung zu einer hohen Mortalitätsrate führen kann (Stamm and Sorg 1993; Nagy and Fekete 2005).

Bei **Hunden** und **Katzen** ist eine Colidiarrhö klinisch schwer von Virusinfektionen zu unterscheiden und betrifft in der Regel nur Welpen. Auch bei diesen Tieren zeigt sich eine profuse sekretorische Diarrhö mit ausgeprägter Dehydratation (Beutin 1999).

Virulenzfaktoren

Hitzelabiles Enterotoxin (LT)

Das hitzelabile Enterotoxin (LT) von *E. coli* ist in seiner Struktur und Funktion dem Cholera Enterotoxin (CT) von *Vibrio cholerae* sehr ähnlich (Sixma, Kalk et al. 1993). Die funktionelle Ähnlichkeit betrifft vor allem die Rezeptorspezifität, die enzymatische Aktivität sowie die Auswirkungen auf die Wirtszelle. Es konnten bisher zwei verschiedene Varianten des LT in ETEC nachgewiesen werden, LT-I und LT-II (Fukuta, Magnani et al. 1988). Da jedoch das LT-II weder beim Tier noch beim Menschen mit der Entwicklung einer Erkrankung assoziiert ist, ist für die Charakterisierung der ETEC ausschließlich das LT-I relevant (Nataro and Kaper 1998). Das LT-I ist ein oligomeres Protein, das aus einer A-Untereinheit und fünf identischen B-Untereinheiten aufgebaut ist. Die B-Untereinheiten vermitteln die Bindungsspezifität, die A-Untereinheit trägt die enzymatische Aktivität. Nach der Sekretion des Toxins ins Periplasma des Bakteriums binden die B-Untereinheiten des Toxins an Zuckerketten des Gangliosids GM₁ auf der Zelloberfläche der Enterozyten (Fukuta, Magnani et al. 1988). Nach Bindung an den Rezeptor wird das Toxin via Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen und mittels Golgiapparat zur basolateralen Seite der Darmzelle transportiert. Hier entfaltet die A₁-Untereinheit, nach proteolytischer Abspaltung von der A-Untereinheit, ihre enzymatische Aktivität (Mekalanos, Collier et al. 1979). Ihr Ziel stellt das hier lokalisierte, zellmembranständige und signalübertragende G_s-Protein dar, welches durch die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität der A₁-Untereinheit aktiviert wird. Dieses wiederum aktiviert daraufhin die Adenylatzyklase. Diese Aktivierung ist auf Grund der ADP-Ribosylierung des G_s-Proteins irreversibel. Es folgt ein Anstieg des cAMPs, der eine Aktivierung der Proteinkinase A hervorruft. Nun werden die sich in der apikalen Membran der Zelle befindlichen Chlorid-Kanäle massenhaft phosphoryliert, dies hat je nach Zelltyp eine Stimulation der Chlorid-Sekretion oder eine Hemmung der NaCl-Absorption zur Folge. Wasser folgt auf Grund des osmotischen Drucks und es kommt zur Diarrhö (Lencer, Constable et al. 1995).

LT-II erhöht den cAMP-Spiegel über den gleichen Mechanismus wie LT-I, bindet jedoch an GD₁ statt an GM₁ (Fukuta, Magnani et al. 1988), woraus wahrscheinlich die Unfähigkeit eine Erkrankung auszulösen resultiert.

Hitzestabiles Enterotoxin (ST)

Im Gegensatz zu den LTs stellen die hitzestabilen Enterotoxine (STen) kleine Polypeptide dar, deren hoher Cystein-Anteil über zahlreiche Disulfidbrücken zur Hitzestabilität dieser Toxine beiträgt. Es gibt zwei verschiedene Klassen von STen, die sich in ihrer Struktur und

Wirkungsweise unterscheiden, STa und STb. Die Gene beider Klassen sind zum größten Teil auf Plasmiden kodiert (So and McCarthy 1980; Lee, Hu et al. 1985).

Während der Sekretion des STa ins Periplasma des Bakteriums besteht dieses aus 53 Aminosäuren. Das endgültige 18 oder 19 Aminosäuren lange Toxin wird hier proteolytisch abgespalten und diffundiert anschließend durch die äußere Membran (Nataro and Kaper 1998). Der Rezeptor für STa ist die apikale Membran der Enterozyten durchspannende Guanylatzyklase C (GC-C). Nach Bindung des Toxins an die extrazelluläre Domäne der GC-C wird deren intrazellulärer Teil enzymatisch aktiv, wodurch die cGMP-Konzentration in der Zelle ansteigt (Field, Graf et al. 1978). Auch dies bewirkt je nach Zelltyp eine verstärkte Chlorid-Sekretion oder eine Hemmung der NaCl-Absorption (Field, Graf et al. 1978) und schließlich einen Austritt von Wasser ins Darmlumen.

Obwohl einige humane ETEC-Isolate STb exprimieren, scheint dieses Toxin besonders mit von Schweinen isolierten ETEC assoziiert zu sein (Handl, Olsson et al. 1992). Es besteht aus 48 Aminosäuren und zeigt keinerlei Ähnlichkeit zu STa (Sukumar, Rizo et al. 1995). Da noch kein spezifischer Rezeptor für STb identifiziert werden konnte, wird angenommen, dass dieses, bevor es endozytiert wird, unspezifisch an die Lipide der Zellmembran bindet (Chao and Dreyfus 1997; Rousset, Harel et al. 1998; Rousset and Dubreuil 1999). Dies führt zur Freisetzung von Serotonin, der Produktion von Prostaglandin E₂ (Peterson and Whipp 1995) sowie einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (Dreyfus, Harville et al. 1993). Letztendlich kommt es zu einer Steigerung der Bicarbonat-Sekretion (Sears and Kaper 1996). Obwohl STb im Gegensatz zu STa zu Epithelzellverlust und teilweiser Zottenatrophie zu führen scheint (Whipp, Kokue et al. 1987), ist der Anteil dieses Toxins an einer Diarrhö noch unklar, da in einer Studie an STb-negativen sowie STb-positiven ETEC mit Ferkeln keine Korrelation zwischen STb und einer Erkrankung festgestellt werden konnte. Sowohl bei den Tieren, die mit STb-positiven als auch bei den Tieren, die mit STb-negativen Stämmen infiziert wurden erkrankten rund 50 % (Casey, Herring et al. 1998).

Das STb kann mit 74 % häufiger bei porcinen ETEC nachgewiesen werden als STa (52 %) (Moon, Schneider et al. 1986).

Kolonisationsfaktoren (KF)

Kolonisationsfaktoren sind Pili bzw. Fimbrien von *E. coli*, die die Adhäsion der Bakterien an Rezeptoren der Darmepithelzellen vermitteln. Für Kolonisationsfaktoren, die mit Infektionen des Menschen assoziiert sind, wurde eine einheitliche Nomenklatur festgelegt. Sie werden „Coli Surface Antigens (CS)“ mit einer Nummer, die der Reihenfolge ihrer Entdeckung entspricht, genannt. Eine Ausnahme stellt das „Colonization Factor Antigen I (CFA/I)“ dar. Bisher wurden nach dieser Nomenklatur 18 Kolonisationsfaktoren humaner ETEC benannt,

CS1 bis CS8, CS12 bis CS15 sowie CS17 bis CS22. CS1, CS2 und CS3 sind Antigenkomponenten des CFA/II (Cravioto, Scotland et al. 1982; Hacker 1992) und werden exprimiert in den Kombinationen CS1 + CS3, CS2 + CS3 oder CS3 alleine. Genauso sind CS4, CS5 und CS6 Antigenkomponenten des CFA/IV (Thomas, McConnell et al. 1985), sie kommen in den Kombinationen CS4 + CS6, CS5 + CS6 oder CS6 alleine vor (Svennerholm, Wenneras et al. 1990). CFA/I hingegen besteht nicht aus mehreren Komponenten, sondern scheint ein homogenes Antigen zu sein. CFA/I, CFA/II und CFA/IV sind mit fast 75% die von humanen ETEC am häufigsten exprimierten KFs und sind daher am besten charakterisiert (Wolf 1997). Kolonisationsfaktoren können nach ihren morphologischen Merkmalen in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Dies sind (i) die starren, dicken stabförmigen, (ii) die sich zu Bündeln zusammenlagernden flexiblen stabförmigen und (iii) die dünnen, flexiblen drahtförmigen. Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der ETEC werden häufig peritrich angeordnete Fimbrien sichtbar, die bei einem einzelnen Bakterium unterschiedliche Morphologien aufweisen können. Meist sind die KFs aus einer einzigen sich wiederholenden Protein-Untereinheit, die zu 2-7 nm breiten helikalen Filamenten zusammengelagert sind, aufgebaut (Cassels and Wolf 1995; Gaastra and Svennerholm 1996). Kolonisationsfaktor-Gene sind in der Regel plasmidkodiert und befinden sich häufig auf den gleichen Plasmiden wie die Gene für die Toxine LT und ST.

Die bestcharakterisierten Kolonisationsfaktoren sind die Fimbrien F4, F5 und F6, die jedoch nur bei tierspezifischen ETEC vorkommen. So sind F4-tragende ETEC nur für Schweine und F5-tragende ETEC nur für Ferkel, Kälber und Lämmer virulent (Nataro and Kaper 1998).

Pathogenese

Prädisponierende Faktoren sind vor allem Abwehrschwäche, meist durch fehlende Versorgung mit kolostralen Antikörpern, Haltungs- und Fütterungsfehler sowie vorausgehende Primärinfektionen mit Viren (besonders Rota- und Coronaviren) und Kryptosporidien. Die Infektion erfolgt in der Regel über kontaminierte Nahrung oder Wasser, beim Menschen ist für die Entstehung einer Erkrankung eine Infektionsdosis von 10^8 bis 10^{10} nötig (Tacket, Reid et al. 1994). Anschließend kolonisieren die Erreger mit Hilfe ihrer wirtsspezifischen KFs den oberen Dünndarm und vermehren sich dort (Koh, George et al. 2008). Nach erfolgter Kolonisierung können Enterotoxine produziert und freigesetzt werden, welche innerhalb kurzer Zeit zu einer sekretorischen Diarrhö führen (Nagy and Fekete 1999; Nagy and Fekete 2005). Die Darmschleimhaut zeigt meist keine oder nur eine geringe Entzündung. Eine Malabsorption in Folge einer Zottenatrophie wie sie bei einer EPEC- oder STEC-Infektion zu sehen ist, liegt in der Regel nicht vor.

2.1.3. Extraintestinal pathogene *E. coli*

2.1.3.1. Uropathogene *E. coli* (UPEC)

E. coli-Stämme, die fähig sind bei immunkompetenten Wirten Urogenitaltraktinfektionen (UGTI) auszulösen, unterscheiden sich von kommensalen *E. coli*, die fast immer Bestandteil der physiologischen Dickdarmflora sind, durch zusätzliche Virulenz-assoziierte Gene (VAGe). Zu den durch die VAGe kodierten Virulenzfaktoren gehören Eisenakquisitionssysteme (u. a. iron-responsive protein (*irp2*)), Adhäsine (u. a. Pilus associated with pyelonephritis (*papC*) und S- und F1C-Fimbrien (*sfa/foc*)), Toxine (Hämolysin, Zytotoxischer Nekrosefaktor (*cnf*) und Sekretiertes Autotransporter Toxin (*sat*)), Serumresistenzfaktoren sowie O- und K-Antigene (Johnson 1991). Andere extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) wie NMEC, SEPEC und APEC weisen häufig ähnliche VAG-Muster auf, weshalb einige Autoren annehmen, dass sich einige UPEC-Stämme von anderen ExPEC nicht oder nur wenig unterscheiden (Russo and Johnson 2000; Johnson and Russo 2002). Andere Autoren halten dagegen sogar eine weitere Unterteilung der UPEC in verschiedene Pathotypen, Zystitis- und Pyelonephritis-Stämme, für sinnvoll (Blanco, Blanco et al. 1996; Tseng, Wu et al. 2002; Welch, Burland et al. 2002; Zhang, Foxman et al. 2002), da sich bei diesen die Prävalenzen einiger VAGe in ihren Studien unterschieden. Möglicherweise lassen sich ExPEC-Pathovaren in Zukunft durch die MLST exakter einordnen (Tartof, Solberg et al. 2005).

Meist als entscheidend für die Pathogenität von UPEC beschriebene Virulenzfaktoren sind die P-Fimbrien, die Sfa-Fimbrien, das Afa-Adhäsin, das Alpha-Hämolysin, der Zytotoxische Nekrosefaktor CNF 1 sowie das Eisenakquisitionssystem Aerobactin mit seinen Rezeptoren (Feria, Machado et al. 2001).

Epidemiologie

E. coli ist beim **Menschen** für 70-95% aller UGT-Infektionen verantwortlich (Kucheria, Dasgupta et al. 2005). Andere seltenere Erreger stellen Gram-positive Kokken, Mykoplasmen, Ureaplasmen, Hefen, Chlamydien und Viren dar. Die Fälle von UGT-Infektionen beim Menschen weltweit wurden auf 150 Millionen pro Jahr mit Behandlungskosten von über 6 Billionen Dollar geschätzt (Lau, Reddy et al. 2008).

Beim **Rind** stellt *E. coli* mit 30% bis 60% ebenfalls den häufigsten Erreger von UGTen dar (Rebhun, Dill et al. 1989; Yeruham, Elad et al. 2006). Andere Erreger beim Rind sind *Corynebacterium renale*, das meist zu einer Nierenentzündung führt, Gram-positive Kokken,

Pseudomonas aeruginosa, Chlamydien, Mykoplasmen, *Arcanobacterium pyogenes* sowie *Fusobacterium necrophorum* (Yeruham, Elad et al. 2006). In Studien zur Prävalenz von UGTI bei weiblichen Rindern konnten Werte von 4% bis 6,2 % ermittelt werden (Markusfeld, Nahari et al. 1989; Yeruham, Elad et al. 2006). Die Mortalitätsrate war mit etwa 50% hoch. Über die Hälfte der Infektionen traten innerhalb der ersten 90 Tage nach dem Kalben auf, dies scheint beim Rind ein prädisponierender Faktor für UGTI zu sein.

In verschiedenen **Schweineherden** wurden bei 11-48% aller Sauen UGTI festgestellt (Krag, Hancock et al. 2008). Auch beim Schwein werden UGTI hauptsächlich durch *E. coli* ausgelöst (Almanjd and Bilkei 2008). Weitere Erreger sind Gram-positive Kokken, seltener *Proteus spp.*, Klebsiellen sowie Pseudomonaden. In einer Studie an Zuchtschweinen wurden 8% aller Todesfälle durch Cystitiden/Pyelonephritiden verursacht, von denen 64% *E. coli*-Infektionen darstellten (Chagnon, D'Allaire et al. 1991). Meist treten sie zum Zeitpunkt der Geburt oder während des Puerperiums auf. *E. coli* spielt bei Schweinen auch besonders im Zusammenhang mit der Coliformen Mastitis eine wichtige Rolle und stellt hier ebenfalls den häufigsten Erreger dar (Wagner 1982; Korudzhiiski, Bozhkova et al. 1987; Korudzhiiski, Bozhkova et al. 1987). Die Prävalenz dieses Syndroms reicht in verschiedenen Herden von 1,1% bis 37,2%. 4% aller Ferkelverluste in diesen Herden waren auf eine Coliforme Mastitis zurückzuführen (Backstrom, Morkoc et al. 1984). Ob hierfür ein spezifischer Pathotyp verantwortlich ist, ist jedoch fraglich, da viele andere Faktoren wie Hypotonie der glatten Muskulatur, große Würfe, verlängerte Trächtigkeitsdauer, Überfütterung, Bewegungsmangel oder Umstallung an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt sind (Dee 1992).

Bei **Hund** und **Katze** sind Infektionen des UGT die häufigsten bakteriellen Infektionen. 14% aller Hunde leiden mindestens einmal im Leben an einer solchen Infektion (Feria, Machado et al. 2001). *E. coli* stellt mit 44% bei Hunden ebenfalls den häufigsten Erreger urogenitaler Infektionen dar (Norris, Williams et al. 2000; Ling, Norris et al. 2001). Neben diesen kommen auch Gram-positive Kokken, Pasteurellen, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* sowie *Klebsiella pneumoniae* als Verursacher vor. Bei Katzen sind allerdings weniger als 2% der Infektionen durch primäre Infektionen verursacht, dies ist auf die hohe Konzentrationsfähigkeit des Urins zurückzuführen (Lees and Rogers 1986; Stegemann, Passmore et al. 2006).

Klinisches Bild einer UPEC-Infektion

Die Mehrheit der durch UPEC verursachten UGTIs wird als unkompliziert bezeichnet. Es handelt sich dabei meist um eine ausschließliche Infektion der Blasenschleimhaut (Bacheller and Bernstein 1997). Am häufigsten betroffen sind **weibliche Tiere** bzw. **Frauen**, auf Grund der kürzeren Harnröhre. Betroffene setzen immer wieder kleine Harnmengen ab, wobei die

Blasenentleerung in der Regel schmerzhaft ist. Der Harn kann trübe und flockig sein. Zum Teil kommt es auch zur Harninkontinenz und Hämaturie. Es lässt sich meist eine hohe Anzahl an Bakterien im Urin nachweisen. Bei einer zusätzlichen Pyelonephritis kommen Nierenschmerzen sowie unspezifischere Symptome, wie Lethargie, Störung des Allgemeinbefindens, Anorexie oder Fieber hinzu (Liebhold, Wendt et al. 1995; Faro and Fenner 1998; Braun, Nuss et al. 2008). Zu solch schweren Verläufen kommt es besonders bei immunsupprimierten Patienten.

Virulenzfaktoren

Adhäsine

Die Adhäsion der Erreger an die Wirtszelloberfläche ist der erste Schritt in der Pathogenese einer UGTI und einer der wichtigsten Faktoren für die Virulenz der UPEC. Diese exprimieren eine große Anzahl unterschiedlicher Fimbrien, die die Adhäsion über verschiedene Rezeptoren in unterschiedlichen Bereichen des UGTes vermitteln. Zu diesen gehören die P-, F1C-, S-, Dr- und Typ 1-Fimbrien (Pere, Nowicki et al. 1987; Virkola, Westerlund et al. 1988; Nowicki, Svanborg-Eden et al. 1989; Antao, Wieler et al. 2009).

Fimbrielle Adhäsine weisen meist eine Länge von 2 µm und einen Durchmesser von 7 nm auf. Jede Fimbrie ist aus einer sich wiederholenden großen Untereinheit und weiteren kleinen Untereinheiten zusammengesetzt.

Für die Adhäsion eines *E. coli*-Stammes an eine Uroepithelzelle ist aber auch deren Rezeptorexpression entscheidend, daher sind einige Individuen empfänglicher als andere (Schaeffer, Rajan et al. 2001).

Es scheint als würde die Fähigkeit der Adhäsion an das Uroepithel auch über den Grad der Ausprägung einer UGTI entscheiden. So ist diese bei Isolaten von Patienten mit Pyelonephritis sehr ausgeprägt und nimmt bei Isolaten von Zystitiden über Isolate von asymptomatischen Bakteriurien bis hin zu fäkalen Isolaten immer mehr ab (Johnson 1991; Zdziarski, Svanborg et al. 2008).

Auf Grund ihrer Eigenschaft, Erythrozyten verschiedener Spezies zu hämagglutinieren lassen sich die Fimbrien von *E. coli* in zwei Gruppen einteilen. Bei den als Mannose-resistent (MRHA) bezeichneten Fimbrientypen bleibt die Fähigkeit zur Hämagglutination auch in Gegenwart von Mannose erhalten, im Gegensatz dazu wird jedoch bei der Gruppe der Mannose-sensitiven (MSHA) Fimbrien die Hämagglutination durch Zugabe von Mannose gehemmt. P-, F1C-, S- und Dr-Fimbrien sind alle MRHA, Typ 1-Fimbrien hingegen sind MSHA (Johnson 1991).

P-Fimbrien

Svanborg-Eden und Hansson entdeckten diese Fimbrien 1978 und beschrieben damit den ersten mit UPEC assoziierten VF (Eden and Hansson 1978). Die Tatsache, dass diesen Fimbrien bei der Agglutination humaner Erythrozyten das P-Blutgruppen-Antigen als Rezeptor dient, führte zu der Bezeichnung als P-Fimbrien (Kallenius, Mollby et al. 1980; Korhonen, Vaisanen et al. 1982). P-Blutgruppen-Antigene stellen Oligosaccharide dar, die als für die Bindung entscheidendes Epitop das Digalaktosid α -D-Gal-(1→4)- β -D-Gal (G-G) beinhalten (Marcus, Kundu et al. 1981). Viele Säugetierzellen, u.a. die Uroepithelzellen tragen dieses Digalaktosid, meist als Komponente der Glycosphingolipide. Die Annahme, dass die P-Fimbrien an G-G binden wird dadurch unterstützt, dass durch die Zugabe dieses Digalaktosids die Agglutination von G-G-tragenden Strukturen gehemmt wird (Leffler and Svanborg-Eden 1981; Kallenius, Svenson et al. 1982; Svenson, Hultberg et al. 1983).

Die P-Fimbrien werden durch 11 chromosomale Gene (*papA* bis *papK* (Pilus assoziiert mit Pyelonephritis)), welche in einem Gen-Cluster lokalisiert sind, kodiert (Hacker 1992). PapA stellt die große Untereinheit dar, hunderte dieser Untereinheiten bilden die Fimbrie. Das eigentliche Adhäsin, welches an der Spitze der Fimbrie lokalisiert ist, heißt PapG und kommt in drei verschiedenen Klassen (I bis III) vor, welche über die Bindungsspezifität entscheiden (Marklund, Tennent et al. 1992; Johnson and Brown 1996). PapE und PapF sind weitere Untereinheiten an der Spitze der Fimbrie, die eine unspezifische Bindung an Fibronectin, eine Komponente der extrazellulären Matrix vermitteln (Westerlund and Korhonen 1993). Das F-Antigen-System zur Katalogisierung der serologisch unterschiedlichen *E. coli*-Fimbrien (Orskov and Orskov 1983) unterscheidet zur Zeit 11 Serovarianten der P-Fimbrie, F7₁, F7₂ sowie F8 bis F16. Diese antigene Variabilität wird vermittelt über Sequenzunterschiede in der PapA-Untereinheit. Ein *E. coli*-Stamm kann bis zu drei verschiedene F-Antigen-Typen der P-Fimbrie tragen (Johnson, Stell et al. 2000).

Zahlreiche Autoren stellten fest, dass UPEC deutlich häufiger P-Fimbrien tragen als andere *E. coli*-Isolate (Hagberg, Jodal et al. 1981; Kallenius, Mollby et al. 1981; Latham and Stamm 1984; Dowling, Roberts et al. 1987), daher ist eine Beteiligung an der Virulenz der Stämme sehr wahrscheinlich. Zudem konnten die Fimbrien in sehr virulenten Stämmen von Entzündungen des Nierenbeckens zu 70% und in weniger virulenten Stämmen aus einfachen Blasenentzündungen nur halb so oft nachgewiesen werden (Johnson 1991). Die Expression dieser Fimbrien ist am stärksten bei 37°C in der exponentiellen Wachstumsphase (Goransson and Uhlin 1984). Durch die P-Fimbrien wird die Ausbreitung der UPEC im UGT erleichtert. Zusätzlich fördern die P-Fimbrien über die Bindung an Glycosphingolipid-Rezeptoren der Mucosazellen, durch die es zu einer Zytokinausschüttung kommt, eine Entzündungsreaktion (Freundus, Wachtler et al. 2001). Zusätzlich löst die

Bindung die Expression weiterer Gene aus, u. a. zur Regulation der Eisenaquisitionssysteme (Zhang and Normark 1996).

F1C- und S-Fimbrien

Diese beiden Fimbrientypen sind genetisch, immunologisch und strukturell eng miteinander verwandt. Beide sind durch Gen-Cluster kodiert (*foc* (sechs Gene (A,C,D und G-I) bzw. *sfa* neun Gene (A-H und S)) (Riegman, Kusters et al. 1990; Schmoll, Morschhauser et al. 1990), die eine große strukturelle Untereinheit (*focA* bzw. *sfaA*), aus der die Fimbrie aufgebaut ist, eine kleine Untereinheit, die als Adhäsion an der Spitze der Fimbrie sitzt, sowie einige zusätzliche Untereinheiten beinhalten (van Die, van Geffen et al. 1985; Johnson 1991; Hacker, Kestler et al. 1993). Beide zeigen eine höhere Prävalenz in ExPEC als in fäkalen *E. coli*. S-Fimbrien scheinen jedoch stärker mit Meningitiden (NMEC) und Septikämien (SEPEC) als mit UGTIs assoziiert zu sein (Ott, Hacker et al. 1986). Ihre Bezeichnung verdanken sie ihrer Bindungsspezifität für Sialyl-Galaktosid-Reste von Glykoproteinen (Parkkinen, Finne et al. 1983; Hacker, Kestler et al. 1993). Ein spezifischer Rezeptor für F1C-Fimbrien ist bisher nicht sicher bekannt, Khan et al. nehmen jedoch auf Grund ihrer Studien ein bestimmtes Disaccharid von Gangliotetraosylceramid an (Khan, Kniep et al. 2000). F1C-Fimbrien konnten zu einem höheren Anteil in UGTI-Isolaten als in fäkalen Kontrollstämmen nachgewiesen werden (Pere, Nowicki et al. 1987). In einer Studie an *papC*-positiven *E. coli*-Isolaten vom Schwein konnten bei 79 % *sfa* und *foc* mittels PCR nachgewiesen werden (Dozois, Clement et al. 1997). *E. coli*-Isolate von Hunden mit UGTI wiesen zu 41 % die entsprechenden Gene auf, im Gegensatz hierzu konnten nur 6 % der Kot-Isolate positiv für *sfa* und *foc* getestet werden (Johnson, Kaster et al. 2003). Unter Mastitis-Isolaten vom Rind fanden sich nur 8 % *sfa*-positive (Kaipainen, Pohjanvirta et al. 2002). Entsprechende Daten zu UGTI-Isolaten vom Rind sind leider bisher nicht erhoben worden. Für beide Fimbrien finden sich Bindungsstellen insbesondere an Epithelzellen der Nierentubuli und Sammelröhren sowie den Endothelzellen der Nierengefäße. Für diese Zellen ist bekannt, dass sie auf ihrer Oberfläche Sialinsäure tragen (Korhonen, Parkkinen et al. 1986; Korhonen, Virkola et al. 1990). Um den Beitrag dieser Fimbrien zur UPEC-Virulenz genauer zu bestimmen, müssen jedoch noch in-vivo-Versuche mit entsprechenden Mutanten durchgeführt werden.

Dr-Adhäsine

Zu dieser Familie von genetisch und strukturell sehr ähnlichen Adhäsinen gehören neben den Dr-Fimbrien auch die afimbriellen Adhäsine AFA-I und AFA-III. Die für die Komponenten

und die Biogenese dieser Fimbrien kodierenden Gene befinden sich in dem *dra*-Gen-Cluster, bestehend aus *draA* bis *draE* sowie *draP*. Die Fimbrien stellen Homopolymere aus DraE-Untereinheiten dar (Zalewska, Piatek et al. 2005). Dr-Adhäsine binden an eine Komponente der Dr-Blutgruppen-Antigene. Dies sind Antigene auf humanen Erythrozyten und Bestandteil des IFC oder Cromer-related Komplex, ein Glykoprotein, welches auch die Cr-, Tc-, Es- und WES-Blutgruppen-Antigene enthält (Daniels, Tohyama et al. 1982; Nowicki, Truong et al. 1988). Zusätzlich binden Dr-Fimbrien an Typ IV Kollagen (Carnoy and Moseley 1997). Dieses Kollagen kommt in der Basalmembran der Nierentubuli sowie den Bowmankapseln vor. Diese Bindung könnte zu einer Etablierung der *E. coli* im interstitiellen Nierengewebe und damit zur Entstehung einer chronischen Nierenentzündung beitragen (Goluszko, Moseley et al. 1997; Selvarangan, Goluszko et al. 2004). Bei einer chronischen Nierenentzündung kommt es zur Atrophie der Nierentubuli sowie zur interstitiellen Fibrose. Die große strukturelle Untereinheit der Dr-Fimbrie DraE scheint gleichzeitig die spezifische Adhäsion an Dr-Blutgruppen-Antigene zu vermitteln, für die Bindung an Typ IV Kollagen könnte jedoch eine andere Untereinheit verantwortlich sein (Van Loy, Sokurenko et al. 2002). Dr-Fimbrien ermöglichen UPEC die Bindung an viele Bestandteile des UGT, u. a. an das Niereninterstitium, die Nierentubuli sowie die Epithelzellen der Harnleiter (Nowicki, Truong et al. 1988).

Dr-Fimbrien sind besonders mit Zystitiden assoziiert, da bei bis zu 50% der in diesen Fällen isolierten *E. coli* entsprechende Sequenzen nachgewiesen werden konnten, bei Nierenbeckenentzündungen war dies nur bei bis zu 26% der Isolate der Fall (Arthur, Johnson et al. 1989; Nowicki, Svanborg-Eden et al. 1989). Epidemiologische Studien haben jedoch gezeigt, dass *afa*-positive Stämme auch zu Durchfällen bei Kindern führen können (Lalioui, Jouve et al. 1999). Das *afa*-Operon tierpathogener Isolate unterscheidet sich jedoch strukturell von dem humanpathogener Isolate.

Typ 1-Fimbrien

Es werden fünf Fimbrientypen unterschieden (Typ I bis V), sie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Dicke (von Typ I mit 3 nm Dicke bis Typ V mit 25 – 30 nm Dicke) sowie in ihrer Bindungsaktivität. Obwohl Typ 1-Fimbrien eine Rolle als VF in der Pathogenese einer UGTI spielen, können die für diese Fimbrien kodierenden Gene (*fimA* bis *fimI*) nicht nur in UPEC, sondern in fast allen *E. coli* nachgewiesen werden (Duguid, Clegg et al. 1979; Johnson 1991). Allerdings können einige Mutationen in diesen Genen zu einer verbesserten Anpassung an ein bestimmtes Habitat führen (Sokurenko, Chesnokova et al. 1998). Ein Typ 1-Fimbrien tragendes Bakterium weist ca. 500 dieser Fimbrien pro Zelle auf, die damit über 8% des Gesamtproteins der Zelle ausmachen. Die neun *fim* Gene sind chromosomal kodiert

und gehören zu einem Operon (Schilling, Mulvey et al. 2001), dessen Expression transkriptional kontrolliert wird (*fimB* und *fimE*) und phasenweise nach dem Alles-Oder-Nichts-Prinzip erfolgt, d.h. entweder ist die gesamte Bakterienoberfläche mit Fimbrien bedeckt, dies ist in der Regel in der stationären Wachstumsphase der Fall, oder die Fimbrien erscheinen überhaupt nicht (Abraham, Freitag et al. 1985; Klemm and Christiansen 1987). *FimA* kodiert für die große strukturelle Untereinheit und zusammen mit den *fimB* bis *fimD* für die Synthese der Fimbrie, *fimH* für die adhäsive Untereinheit an der Spitze der Fimbrie (Johnson 1991). Da diese Untereinheit, zusammen mit den Produkten der Gene *fimF* und *fimG*, über die Bindungsspezifität, und damit über eine erfolgreiche Adhäsion entscheidet, steht sie unter einem hohen selektiven Druck (Klemm and Christiansen 1987; Weissman, Chattopadhyay et al. 2006). Die Bindung erfolgt an Mannosiden, die weit verbreitet auf Epithelien und Erythrozyten verschiedener Spezies vorkommen. Beim Menschen binden sie außer an Epithelzellen der Blase und der Vagina auch an Darmepithelzellen (Falkowski, Edwards et al. 1986; Wold, Thorssen et al. 1988; Wu, Sun et al. 1996). Zusätzlich trägt der hydrophobe Charakter der Fimbrien zur Bindung bei (Hanson and Brinton 1988).

Die Bedeutung der Typ 1-Fimbrien für die Virulenz der UPEC konnte durch verschiedene Experimente eindeutig bestätigt werden (Connell, Agace et al. 1996; Langermann, Palaszynski et al. 1997; Langermann, Mollby et al. 2000), u.a. konnte in einem Tierversuch die Kolonisation der Harnblase mit *E. coli* durch Vakzinierung mit FimH um über 99 % reduziert werden. Eine Studie weist außerdem darauf hin, dass die Fimbrien nicht nur über die durch sie vermittelte Adhäsion zur Pathogenese der UGTI beitragen, sondern auch dazu fähig sind eine Apoptose der Wirtszelle auszulösen und anschließend die Invasion und Kolonisation des zerstörten Gewebes zu fördern (Mulvey, Lopez-Boado et al. 1998).

Toxine

Alpha-Hämolysin

Für die Bildung, Aktivierung und Sekretion dieses Zytolysins sind die vier in einem Operon liegenden Gene *hlyA* bis *hlyD* essentiell (Felmlee, Pellett et al. 1985). *HlyA* kodiert für das inaktive Protoxin des Alpha-Hämolysins (α -Hly), welches durch das durch *hlyC* kodierte Zytoplasmprotein aktiviert (Stanley, Koronakis et al. 1998) und anschließend mittels Typ I-Sekretionssystem, welches durch die Produkte der Gene *hlyB* und *hlyD* gebildet wird, aus der Bakterienzelle heraus transportiert wird (Wagner, Vogel et al. 1983).

Im extrazellulären Raum erfährt das Toxin durch Kalziumanlagerung eine Konformationsänderung, die erst eine Bindung an die Membran der Zielzelle ermöglicht (Boehm, Welch et al. 1990). Die Bindung erfolgt über zwei Wege, zum einen über eine

reversible Adsorption, ob diese Bindung durch einen spezifischen Rezeptor vermittelt wird ist nicht bekannt, und zum anderen über eine irreversible Insertion, die durch Acylketten des Hämolytins vermittelt wird (Herlax and Bakas 2003). Am N-terminalen Ende des Toxins befinden sich vier hydrophobe α -Helices, die nun eine transmembrane zwei nm breite Pore in der Zielzelle bilden (Stanley, Koronakis et al. 1998; Skals, Jorgensen et al. 2009). Dies führt ab einer bestimmten Toxinkonzentration zur Zellyse.

Zur Pathogenese einer UGTI trägt dieses Toxin, neben der direkten Gewebeschädigung und der damit verbundenen, das Wachstum der Bakterien fördernden Eisenfreisetzung (Mobley, Green et al. 1990; Island, Cui et al. 1998), durch die Zerstörung der Immunzellen des Wirtes bei (Bhakdi, Muhly et al. 1990). Zusätzlich bewirken sublytische Toxinkonzentrationen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und wirken somit proinflammatorisch (Grimminger, Scholz et al. 1991; Grimminger, Rose et al. 1997).

Alpha-Hämolytin ist häufig mit P-Fimbrien assoziiert und zusammen mit diesen in der chromosomalen PAI II kodiert. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass Alpha-Hämolytin in UPEC eine höhere Prävalenz (20 bis 64%) hat als in fäkalen *E. coli*-Stämmen (7,3 bis 12%) (Johnson 1991; Blum, Falbo et al. 1995; Mitsumori, Terai et al. 1999; May, Gleason et al. 2000; Kerényi, Allison et al. 2005).

Zytotoxischer Nekrosefaktor (ZNF) 1/2

ZNF 1 und ZNF 2 sind zwei sehr ähnliche Holoproteine, bestehend aus 1.014 Aminosäuren. Das für ZNF 1 kodierende Gen (*cnf1*) liegt ebenfalls häufig mit *pap* und *hly* zusammen auf der PAI II und kann in UPEC signifikant häufiger nachgewiesen werden als in fäkalen *E. coli*-Isolaten (Caprioli, Falbo et al. 1987; Falbo, Famiglietti et al. 1992; Dobrindt, Blum-Oehler et al. 2002; Johnson, Scheutz et al. 2005). Das Toxin ZNF 2 ist auf einem Plasmid kodiert, auf dem sich häufig auch das Gen für das fimbrielle Adhäsion F17b befindet (De Rycke, Milon et al. 1999). ZNF 1-positive Stämme konnten von vielen Tieren und dem Menschen immer wieder isoliert werden, wohingegen ZNF 2-positive Stämme bisher nur von Wiederkäuern isoliert wurden (De Rycke, Milon et al. 1999).

Nach Bindung des Toxins an einen bisher unbekanntem Rezeptor der Wirtszelle wird dieses endozytiert. Nach Freisetzung aus dem Endosom deamidiert das Toxin ein Rho-GTP-bindendes Protein, dies führt schließlich über eine permanente Aktivierung der Rho-GTPase zu einer starken Reorganisation des Zytoskeletts der Wirtszelle zu dicken Stressfasern und dadurch zur Entstehung multinukleärer Riesenzellen (Boquet 2001).

ZNF 1 scheint bei Epithelzellen ein phagozytisches Verhalten auszulösen und könnte damit zur Aufnahme des Bakteriums durch die Wirtszelle führen. Dies wäre eine mögliche

Erklärung für die häufige Assoziation ZNF1-exprimierender *E. coli* mit systemischen Erkrankungen bei Mensch und Tier.

Obwohl ZNF1 nachweisbar Apoptose in Blasenepithelzellen auslöst (Mills, Meysick et al. 2000), konnte in einem Maus-Modell kein Virulenzverlust für *cnf1*-Mutanten bei UGTI erkannt werden (Johnson, Drachenberg et al. 2000).

ZNF 2 konnte in einer Untersuchung an 396 *E. coli*-Isolaten von Kälbern bei 6,1 % nachgewiesen werden (Osek 2001). Für ZNF 1 konnten Prävalenzen von 13 bis 45,8% festgestellt werden (Usein, Damian et al. 2001; Denden, Mahdouani et al. 2004; Ewers, Li et al. 2007)

Sekretiertes Autotransporter Toxin

Dieses 2000 von Guyer et al. als Virulenzdeterminante von UPEC identifizierte Protein gelangt über ein Autotransporter Sekretionssystem in den extrazellulären Raum (Guyer, Henderson et al. 2000). Dies erfolgt in zwei Schritten, zunächst wird es via Sec-System durch die innere Membran und anschließend, über die Bildung einer Pore durch die Autotransporterdomäne des Proteins selbst, durch die äußere Membran geschleust (Guyer, Henderson et al. 2000).

Sat ist eine Serinprotease, gehört mit Tsh und Pic zur SPATE-Familie (serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*) und scheint zu einer Vakuolisierung der Wirtszelle und zu Läsionen ihrer interzellulären Verbindungen zu führen (Guyer, Radulovic et al. 2002; Guignot, Chaplais et al. 2007).

Auf Grund der Tatsache, dass Sat Nieren- und Blasenepithelzellen schädigt sowie eine Entzündungsreaktion fördert, liegt eine Beteiligung an der Pathogenese einer UGTI nahe. Dies wird insbesondere dadurch untermauert, dass dieses Toxin signifikant häufiger bei humanen UGTI-Isolaten (86-88%) als bei fäkalen Isolaten (14-16%) nachgewiesen werden konnte (Guyer, Henderson et al. 2000; Guignot, Chaplais et al. 2007).

Eisenakquisitionssysteme

Sowohl kommensale als auch pathogene Bakterien benötigen für ihr Wachstum Eisen in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l. Obwohl die absolute Eisenkonzentration in biologischen Flüssigkeiten bei über 2×10^{-3} mol/l liegt, ist im Darm, Blut und Gewebe von Mensch und Tier durch die Einbindung fast des gesamten Eisens in Proteine das frei verfügbare Eisen mit einer Konzentration von 10^{-18} mol/l sehr rar (Annamalai, Jin et al. 2004). Jedoch können Bakterien durch die Freisetzung hoch-affiner Eisen-Chelatbildner (Siderophoren), die Eisen aus bestehenden Komplexen im Wirt herauszulösen vermögen, oder durch die Expression

von Rezeptoren für die eukaryotischen Eisen-Proteine wie Transferrin und Laktoferrin und deren Aufnahme, ausreichend Eisen aus der Umgebung gewinnen (Neilands 1981; Konopka and Neilands 1984; Wooldridge and Williams 1993; Cornelissen and Sparling 1994).

Die häufigsten von *E. coli* produzierten Siderophoren sind Enterobaktin und Aerobaktin. Während ersteres sowohl von pathogenen als auch von nicht pathogenen *E. coli*-Stämmen gebildet wird, wird letzteres hauptsächlich von ExPEC gebildet (Carbonetti, Boonchai et al. 1986; Johnson, Moseley et al. 1988). Dies ermöglicht UPEC bei sehr geringer Eisenverfügbarkeit, wie diese unter anderem im Urin vorliegt, zu wachsen. Weitere für die Virulenz von UPEC relevante Bestandteile von Eisenakquisitionssystemen sind das vermutlich für den Transport bestimmter Siderophoren wichtige „Iron Responsive Element“ (*ireA*), der Rezeptor für Siderophoren „Iron Receptor“ (*iroN*), der Hämin-Transporter „*E. coli* Haem Utilisation“ (*chuA*) sowie die Siderophore Yersiniabaktin („Iron Repressible Protein“ (*irp2*)) und deren Rezeptor „Ferric Yersinia Uptake“ (*fyuA*) (Schubert, Rakin et al. 1998; Okeke, Scaletsky et al. 2004; Hancock, Ferrieres et al. 2008).

Aerobaktin

Da Aerobaktin die häufigste mit UPEC assoziierte Siderophore darstellt, soll diese im Folgenden genauer besprochen werden. Diese Siderophore entzieht den Eisen-bindenden Proteinen des Wirtes nach der Sekretion in den extrazellulären Raum Fe^{3+} , wird anschließend über einen Proteinrezeptor in der Außenmembran aufgenommen und im Bakterium wieder vom Eisen befreit (Carbonetti and Williams 1984; de Lorenzo and Neilands 1986).

Dies wird durch fünf in einem Operon liegenden Genen kodiert. Vier dieser Gene, *iucA* bis *iucD* (Iron Uptake Chelate) kodieren für Enzyme, die die Synthese des Aerobaktin katalysieren, das fünfte Gen *iut* (Iron Uptake) für den Aerobaktin-Rezeptor auf der Außenmembran. Dieses Operon kann entweder auf dem Chromosom liegen oder auf einem ColV-Plasmid, wo es von mobilen Elementen flankiert wird (Neilands 1992).

Für Aerobaktin konnten bei ExPEC Prävalenzen von bis zu 76% festgestellt werden (Usein, Damian et al. 2001; Santo, Macedo et al. 2006)

Serumresistenzfaktoren

Ohne Serumresistenzfaktoren werden Bakterien in menschlichem oder tierischem Serum durch die lytische Aktivität des Komplementsystems abgetötet (Taylor 1983). Dieses wird seltener über den von spezifischen Antikörpern abhängigen klassischen Weg aktiviert, als durch den alternativen Weg, der durch aktivierende Oberflächen, die die meisten

mikrobiellen Erreger aufweisen, in Gang gesetzt wird. Die zentrale Komponente ist C3b, nach deren Anlagerung an eine fremde Zelle ein aus den Komplementfaktoren C5-C9 bestehender Komplex (Membrane Attack Complex (MAC)) gebildet wird, der zur Lyse der Zelle führt. Zusätzlich führt die Auslösung des Komplementsystems zur Aktivierung immunkompetenter Zellen und zur Opsonierung des Bakteriums zur Phagozytose.

Wie resistent ein *E. coli*-Stamm gegenüber diesen Komponenten des Wirtsserums ist, wird durch dessen K- und O-Polysaccharide sowie verschiedene Oberflächenproteine bestimmt (Johnson 1991).

Kapselantigene

Über 80 serologisch unterschiedliche Kapsel-Polysaccharide werden unter den verschiedenen *E. coli*-Stämmen gebildet (Jann and Jann 1992). Sie bestehen aus linearen Polymeren von sich wiederholenden Kohlenhydrat-Untereinheiten. Diese Kapseln werden in vier Gruppen eingeteilt (Gruppe I bis IV). Die meisten *E. coli* tragen Gene, die für Kapseln der Gruppe I kodieren (Whitfield and Roberts 1999), können jedoch gleichzeitig Kapseln der Gruppen II und III tragen, die an der Virulenz von UPEC beteiligt zu sein scheinen (Johnson and Stell 2000). Das Gen-Cluster (*kps*) der Gruppe I- Kapseln weist eine konservierte Organisation auf. Es beginnt mit den Genen *orfX*, *wza*, *wzb* und *wzc*, deren Nukleotidsequenz bei jedem Serotyp gleich ist, diese Region bestimmt die Zugehörigkeit zur Gruppe I und ist essentiell für den Zusammenbau der Polymere und den Transport zur Oberfläche. Die dann folgenden kapseltypspezifischen Gene kodieren für die Synthese der Polymere und sind daher sehr unterschiedlich (Whitfield and Roberts 1999). Auch Kapseln der Gruppe II und III sind durch Cluster kodiert, die Gene enthalten, die verantwortlich sind für die Synthese und Polymerisation der Untereinheiten sowie andere Gene für den Transport durch die innere und äußere Membran (Johnson 1991).

Einige Kapseln sind kaum oder gar nicht immunogen, da sie bestimmten Strukturen des Wirtes sehr ähneln oder mit diesen identisch sind (Jann and Jann 1992).

Von den 80 Kapseltypen kommen bei UPEC nur einige bestimmte vor, dies sind vor allem K1, K2, K5, K6, K12, K13, K29 und K51 (Jann and Jann 1992).

Es wird angenommen, dass die Ausbildung einer Kapsel auch zur Virulenz der UPEC beiträgt, zum einen in dem dies die Adhäsion fördert, und zum anderen durch einen Schutz vor Phagozytose. Die Kapselantigene scheinen die Bindung des Komplementinhibitors B1H an C3b zu steigern und blockieren damit die Komplementkaskade des klassischen sowie des alternativen Weges (Harber, Topley et al. 1986; Leying, Suerbaum et al. 1990). Es konnte gezeigt werden, dass die Serumresistenz eines Stammes proportional zur Menge an Kapselmaterial steigt und besonders hoch für den Kapseltyp K1 ist (Brooks, O'Grady et al.

1980; Leyer, Suerbaum et al. 1990). Dieser Kapseltyp ist auch bei APEC und NMEC häufig und ist mit hoch virulenten Stämmen assoziiert (Bonacorsi and Bingen 2005; Kim, Kang et al. 2005; Ewers, Li et al. 2007; Ananias and Yano 2008). Wie entscheidend der Beitrag einer Kapsel zur Serumresistenz eines Stammes ist, ist denoch nicht bekannt und wird kontrovers diskutiert, da bei klinischen Isolaten für diese beiden Eigenschaften keine Assoziation gefunden werden konnte, es könnten andere Faktoren entscheidender sein (Johnson 1991).

O-Antigene

Diese hitzestabilen somatischen Antigene sind Bestandteile des Lipopolysaccharid-(LPS)-Komplexes der Zellwand. Die O-Antigene bestehen aus dem Lipid A, einer Kernregion, bestehend aus einem Oligosaccharid, sowie einer O-spezifischen Polysaccharidseitenkette, die die serologische Spezifität bestimmt (Reeves 1995). Bei Abwesenheit dieser O-Ketten wird das LPS als rauh bezeichnet. Es wurden bisher über 180 verschiedene Seitenketten identifiziert (Orskov and Orskov 1992). Die am häufigsten mit UGTI assoziierten O-Serotypen sind O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O50 und O75 (Li, Liu et al.; Johnson 1991; Johnson, Kaster et al. 2003; Abe, Salvador et al. 2008; Lau, Reddy et al. 2008). Besonders die schwereren UGTIen werden meist von Stämmen verursacht, die einer dieser Serotypen angehören. Ob diese speziellen Serotypen die Virulenz der UPEC steigern ist unklar, es ist möglich, dass es sich lediglich um Marker für Stämme mit einem bestimmten phylogenetischen Hintergrund handelt, die über verschiedene Virulenzdeterminanten verfügen. Sicher ist jedoch, dass Stämme ohne O-Antigene, d.h. mit rauhem Lipopolysaccharid, eine geringere bis keine Serumresistenz aufweisen (Johnson 1991). Für die Serumresistenz scheint besonders die Dicke der O-Antigen-Schicht entscheidend zu sein, da durch diese der Kontakt zwischen dem MAC und der Bakterienzelle unterbrochen werden könnte (Taylor 1983; Goldman, Joiner et al. 1984).

Mindestens 50 Gene, die über das gesamte *E. coli*-Chromosom verteilt liegen, sind nötig für die Synthese der LPS.

Andere Serumresistenzfaktoren

Das *iss* (increased serum survival)-Gen konnte in etwa 60% der UPEC-Stämme und 75% bis 91% der ExPEC-Stämme nachgewiesen werden, jedoch nur in wenigen (18%) fäkalen kommensalen *E. coli* und führt zu einer 20-fachen Steigerung der Resistenz eines Stammes gegenüber dem Komplementsystem des Wirtes (Rodriguez-Siek, Giddings et al. 2005; Rodriguez-Siek, Giddings et al. 2005; Johnson, Wannemuehler et al. 2008). *Iss* stellt ein Lipoprotein der Außenmembran dar (Lynne, Skyberg et al. 2007), welches vermutlich über

eine Inhibition der MAC-Aktivität wirkt (Johnson 1991). Das *iss*-Gen ist in einer PAI des ColV-Plasmids lokalisiert, welches auch auf Grund weiterer auf ihm gelegenen Gene (s.o.) mit Isolaten aus Pyelonephritiden assoziiert ist (O'Hanley, Low et al. 1985; Funfstuck, Tschape et al. 1986). Da jedoch einige *E. coli*-Stämme auch *iss*-positiv sind, aber kein ColV-Plasmid besitzen, ist davon auszugehen, dass das *iss*-Gen auch auf dem Chromosom zu finden ist, was mehrfach bestätigt werden konnte (Johnson, Wannemuehler et al. 2008).

Ein weiteres Lipoprotein der Außenmembran, das *traT* scheint durch Inaktivierung des MAC die Serumresistenz eines Stammes zu erhöhen (Sukupolvi and O'Connor 1990). Obwohl es häufiger in ExPEC (bis 77%) als in fäkalen *E. coli*-Stämmen (38%) nachgewiesen werden kann (Kanukollu, Bieler et al. 1985; Rodriguez-Siek, Giddings et al. 2005), ist nicht sicher ob es tatsächlich die Virulenz eines Stammes erhöht (Johnson 1991). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das *traT*-Gen die Serumresistenz eines unbekapselten Stammes zu steigern vermag (Aguero, Aron et al. 1984).

Ein weiterer Serumresistenzfaktor stellt das Protein der Außenmembran *OmpT* (outer membrane protein T) dar (Vandeputte-Rutten, Kramer et al. 2001), der Prototyp der OmpT-Familie (McCarter, Stephens et al. 2004). Das aktive Zentrum dieser Serin-Endoprotease befindet sich auf der extrazellulären Seite. Die Funktion dieses Membran-gebundenen Enzyms ist noch nicht vollständig geklärt (Baaden and Sansom 2004). Es konnte in UPEC bis zu 94%, in fäkalen *E. coli* nur zu 51% nachgewiesen werden (Johnson, Scheutz et al. 2005; Rodriguez-Siek, Giddings et al. 2005).

Pathogenese

Es wird angenommen, dass die Infektion mit der Kolonisierung des Darms durch einen UPEC-Stamm beginnt. Nach Übertragung auf die Harnröhre, welche bei weiblichen Individuen auf Grund der anatomischen Gegebenheiten besonders leicht möglich ist, und deren Kolonisierung, steigen die Erreger durch die Harnröhre bis in die Blase auf. Die Bedingungen in der Blase aktivieren die Expression der Typ 1-Fimbrien, wodurch eine feste Adhäsion an das Übergangsepithel der Blase möglich wird. Diese Adhäsion führt zur Apoptose und zum Abschilfern der Epithelzellen. Bei Pyelonephritis-Stämmen wird die Expression der Typ 1-Fimbrien schließlich beendet, wodurch sich die Erreger vom Blasenepithel lösen, über die Harnleiter in die Nierenbecken aufsteigen und dort durch Expression der P-Fimbrien am Nierenepithel adhäreren können. Hier kommt es unter anderem durch α -Hämolyisin zur Gewebeschädigung und Auslösung einer Entzündungsreaktion. Auch durch die Sekretion des Sat-Toxins kann es letztendlich zu einem Durchbruch der proximalen Tubuli und damit zu einem Eintritt der Erreger in den Blutkreislauf kommen. Viele weitere oben erwähnte VAGe tragen zur Pathogenese einer

UGTI bei, indem sie das Überleben und Wachstum der Bakterien im Urin sichern, eine Entzündung fördern, zellschädigend wirken, die Ausschwemmung der Erreger über den Urin verhindern oder zur Invasion führen (siehe ZNF 1) (Kaper, Nataro et al. 2004).

Auch bestimmte Diäten können durch eine Senkung der Azidität und damit antibakteriellen Wirkung des Urins eine Besiedlung der Blase durch verschiedene Erreger fördern.

2.2. Verwandtschaftsanalyse

2.2.1. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Die MLST ist eine relativ junge Typisierungsmethode die erstmals 1998 für *Neisseria meningitidis* angewandt wurde. Von da an wurde sie für molekulare epidemiologische Studien von immer mehr Spezies verwendet, unter anderem für *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni* und *Streptococcus pyogenes* (<http://www.mlst.net/databases/default.asp>). Auf Grund der Reproduzierbarkeit der Methode entstanden und entstehen immer mehr Datenbanken, die via Internet für Forscher in der ganzen Welt nutzbar sind (Spratt 1999; Urwin and Maiden 2003; Ibarz Pavon and Maiden 2009). Mittels MLST kann einerseits die Struktur der Population ermittelt und andererseits einzelne Sequenztypen (ST) und damit einzelne Isolate charakterisiert werden (Spratt and Maiden 1999). So wird z. B. angenommen, dass die Zugehörigkeit von Stämmen zu einem bestimmten ST mit einer gewissen Virulenz assoziiert sein kann, da Sequenztypen die Phylogenie der Bakterien widerspiegeln.

Um die Verwandtschaft verschiedener *E. coli*-Isolate zu ermitteln wurden bisher meist klonale Analysen mit einer begrenzten Zahl an Isolaten innerhalb eines Labors durchgeführt. Bei klonalen Analysen werden Isolate direkt miteinander verglichen und nur relativ zueinander eingeordnet. Hier sind unter anderem die Methoden Pulsfeld Gel-Elektrophorese (Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)), Zufällige Vervielfältigung polymorpher DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)) zu nennen (Foley, Lynne et al. 2009).

Bei der PFGE wird die DNA des zu prüfenden Stammes mit selten schneidenden Endonukleasen in relativ große Fragmente gespalten, die sich bei verschiedenen Stämmen einer Spezies unterscheiden. Nach gelelektrophoretischer Trennung, bei der die Richtung des elektrischen Feldes in einer bestimmten Frequenz geändert wird, um auch sehr große Fragmente eindeutig zu separieren, erzeugen diese Fragmente für den jeweiligen Stamm

typische Bandenmuster (genetischer Fingerabdruck) (Kawamori, Hiroi et al. 2008; Durmaz, Otlu et al. 2009; Lim, Yasin et al. 2009).

Bei der RAPD wird eine PCR mit willkürlich gewählten kurzen, ca. 8-12 Nukleotid langen Primern und der DNA des zu untersuchenden Bakterienstammes durchgeführt. Da die zu den Primern komplementären DNA-Sequenzen, sofern diese überhaupt vorhanden sind, bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich verteilt sind, entstehen entsprechend unterschiedliche Amplifikate, die nach gelelektrophoretischer Trennung ein stamm-spezifisches Bandenmuster ergeben (Peixoto, Bando et al. 2001; Carvalho, Irino et al. 2007; Moore, Watabe et al. 2008; Lim, Yasin et al. 2009).

Bei der RFLP wird die Bakterien-DNA ebenfalls mittels Restriktionsenzymen gespalten. Durch Mutationen oder Sequenzpolymorphismen unter den verschiedenen Stämmen werden die entsprechenden Erkennungssequenzen der Enzyme zerstört oder neu gebildet, so dass die DNA in eine stamm-spezifische Zahl an Fragmenten geschnitten wird und diese Fragmente nach gelelektrophoretischer Trennung einen genetischen Fingerabdruck ergeben (Cookson, Bennett et al. 2007; Japoni, Gudarzi et al. 2008).

Aktuelle Untersuchungen an *E. coli*-Isolaten, bei denen die auf solchen Makrorestriktionsanalysen basierenden Dendrogramme mit den Ergebnissen einer MLST verglichen wurden, haben jedoch gezeigt, dass Stämme mit gleichem oder ähnlichem genetischen Fingerabdruck z. T. in ganz unterschiedlichen Linien (Phylotypen) vorkommen, d. h. polyphletisch sind (Wirth, Falush et al. 2006). Klonale Analysen eignen sich deshalb prinzipiell nur für den Vergleich von Stämmen, die aus räumlich und zeitlich begrenzten Arealen isoliert wurden, z. B. Ausbruchgeschehen.

Dass Stämme, die ihren letzten gemeinsamen Vorläufer vor mehreren Millionen Jahren hatten, einen sehr ähnlichen genetischen Fingerabdruck aufweisen können, liegt daran, dass *E. coli* eine schwach klonale, also auch durch Rekombination gekennzeichnete, bakterielle Spezies ist (Spratt and Maiden 1999). Es kommt immer wieder zu horizontalem Gentransfer (HGT) von so genannten akzessorischen Genen, die größten Teils auf mobilen Elementen lokalisiert sind. So kann es vorkommen, dass nah verwandte Stämme ein sehr unterschiedliches Genom aufweisen. Um die phylogenetisch relevanten Unterschiede darzustellen ist es demnach unverzichtbar die essentiellen Gene, das so genannte Kerngenom zu betrachten. Diese Housekeeping-Gene sind nicht nur hoch konserviert, da Mutationen in ihnen meist negativ selektiert werden, sondern unterliegen auch sehr selten dem HGT (Smith, Feil et al. 2000; Nemoy, Kotetishvili et al. 2005; Wirth, Falush et al. 2006; Li, Li et al. 2008). Diese Tatsachen können bei der MLST berücksichtigt werden. Zwar können auch Housekeeping-Gene durch Rekombination ausgetauscht werden, jedoch sind die hierdurch entstehenden Fehler in der Einordnung der Stämme durch die Tatsache, dass

immer mehrere dieser Gene analysiert werden, so gering, dass sie zu vernachlässigen sind, bzw. durch entsprechende bioinformatische Analysen bereinigt werden können.

Die genetischen Fingerabdrücke basieren zudem nur auf Fragmentlängen und sagen nichts über die Sequenzunterschiede zweier gleich langer Fragmente aus.

Ein weiterer entscheidender Nachteil der oben genannten klonalen Methoden zur Analyse der Langzeitepidemiologie einer Bakterienpopulation ist deren unzureichende Standardisierung.

Da diese Methoden von sehr vielen Bedingungen abhängig sind, sind sie schwerer reproduzierbar und deshalb eher laborspezifisch. Dies führt dazu, dass die Daten zwar laborübergreifend gesammelt werden können, aber ein Vergleich sehr erschwert wird (Maiden, Bygraves et al. 1998; Spratt 1999).

Da die meisten phylogenetischen Studien über *E. coli* in der Vergangenheit auf bandenbasierten Methoden beruhten, ist das Verständnis über die Mikroevolution von *E. coli*-Pathogenen noch lückenhaft.

Für Ausbruchssituationen, bei denen es sich um zeitlich und räumlich epidemiologisch eng zusammenhängende Isolate handelt, sind klonale Analysen jedoch brauchbar und verlässlich (Smith, Feil et al. 2000). Für epidemiologische Langzeitstudien und um den phylogenetischen Hintergrund einer gesamten Bakterienpopulation zu ermitteln, ist die MLST jedoch die zuverlässigste Methode, daher sollten zukünftige molekulare epidemiologische Analysen auf der Ermittlung des Phylotypen mittels MLST basieren (Spratt 1999).

Zur Multilokus Sequenztypisierung (MLST) werden von jedem *E. coli*-Isolat in der Regel sieben Housekeeping-Gene, bzw. ca. 500 bis 850 bp lange Abschnitte dieser Gene mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenzanalysiert (Smith, Feil et al. 2000).

Für die vorliegende Studie wurden die Gene genutzt, auf denen die *E. coli* MLST-Datenbank der University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) beruht. Dies sind die Gene *adh* (Adenylat-Kinase), *icd* (Isocitrat-Dehydrogenase), *fumC* (Fumarat-Hydratase), *mdh* (Malat-Dehydrogenase), *gyrB* (Gyrase B), *purA* (Adenylosuccinat-Synthase) und *recA* (Rekombinase) (Wirth, Falush et al. 2006).

Je nach Sequenz können diese Gene anhand der Datenbank einem bestimmten Alleltypen, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert wurden, zugeordnet werden. Die Kombination dieser sieben Nummern (Allelprofil) ergibt einen Sequenztypen (ST). Ähnliche STen werden weiterhin zu ST-Komplexen zusammengefasst (Urwin and Maiden 2003; Pitondo-Silva, Minarini et al. 2009). Nach der Datenbank der University College Cork müssen diese aus mindestens drei STen bestehen, von denen jeder mit mindestens einem anderen ST des selben Komplexes in sechs Alleltypen übereinstimmt.

Da sich die Allele eines Gens, auf Grund einer relativ konstanten Mutationsrate, bei zwei Stämmen umso mehr unterscheiden, je früher sich diese Stämme in der Phylogenie der

Spezies getrennt haben, kann mit Hilfe dieser Daten ein phylogenetischer Stammbaum erstellt werden, bzw. diese Isolate in einen bestehenden Stammbaum eingeordnet werden (Spratt 1999; Spratt and Maiden 1999).

Die MLST basiert auf der zuvor für epidemiologische Langzeitstudien am häufigsten angewandten Typisierungsmethode, der Multilokus Enzym Elektrophorese (MLEE). Die MLEE nutzt indirekt genotypische Polymorphismen durch Unterschiede der elektrophoretischen Mobilität einzelner Enzyme des Primärmetabolismus, das heißt den Produkten der Housekeeping-Gene. Die unterschiedliche Mobilität ist Folge von Mutationen, die zu Ladungsveränderungen in den entsprechenden Enzymen führen. Jedes Isolat wird schließlich charakterisiert durch die Kombination der untersuchten Enzymvariationen und einem Elektrophorese-Typ (ET) zugeordnet, welcher mit dem ST bei der MLST zu vergleichen ist (Spratt 1999; Urwin and Maiden 2003).

Die MLEE weist jedoch zwei entscheidende Nachteile gegenüber der MLST auf. Zum einen können durch die MLST mehr Variationen erkannt werden, da stumme Mutationen bei der MLEE keine Rolle spielen. Dies bedeutet es können mehr Allele pro Locus benannt und ein höherer Differenzierungsgrad erreicht werden. Zum anderen sind die durch die MLEE, einer auf Banden basierenden Methode, gewonnenen Daten laborabhängig und können nur bedingt mit denen anderer Labors verglichen werden. Die Daten sind zudem schlechter zu speichern, da es sich um Bilder und nicht so eindeutige, solide Daten, wie es die Allelsequenzen der MLST darstellen, handelt (Spratt 1999).

Die MLST-Datenbank enthält derzeit (Aug. 2010) bereits ca. 3.100 *E. coli*-Isolate von den verschiedensten Wirten, Erkrankungen und Ländern, das heißt, dass die im Rahmen dieser Studie untersuchten Isolate vor dem Hintergrund der gesamten *E. coli*-Population dargestellt und phylogenetisch eingeordnet werden können.

Es gibt zwei Methoden den Grad der Verwandtschaft sequenztypisierter Stämme abzuschätzen und so einen Stammbaum zu erstellen. Zum einen sind dies Cluster-Prozeduren. Sie basieren auf paarweisen Unterschieden in den Allelprofilen (Kombination der sieben Nummern). Der Nachteil dieser Methode ist ein Verlust von Daten, da die Unterschiede in den Allelprofilen nicht entsprechend der Unterschiede in den Sequenzen gewertet werden, d. h. es wird nicht berücksichtigt ob sich zwei Allele in einem oder in zehn Basenpaaren unterscheiden. Außerdem ist keine Aussage über die Zeitperiode seit der Trennung zweier Stämme von einem gemeinsamen Vorfahren möglich. Die Cluster-Prozeduren sind jedoch gut geeignet für nahverwandte Isolate innerhalb eines klonalen Komplexes.

Die andere Methode ist eine phylogenetische Analyse, die auf den Allelsequenzen basiert. Hierbei werden die Sequenzen entweder Gen für Gen oder nach Addition der Sequenzdaten aller sieben Gene („Supergen“) verglichen.

Der Vorteil dieser Analyse ist, dass die Anzahl der Mutationen als molekulare Uhr dienen kann, und so eine Anpassung des Stammbaums an einen Zeitmaßstab möglich ist (Aanensen and Spratt 2005). Mit der MLST steht eine molekulare epidemiologische Analyseverfahren zur Verfügung mit der die Phylogenie der *E. coli*-Population eindeutig und zuverlässig dargestellt werden kann, was die Grundlage aller weiteren Untersuchungen ist. Die erhaltenen Sequenzdaten sind eindeutig und unabhängig von Laborbedingungen, dies ermöglicht die Einrichtung einer zentralen, weltweiten Datenbank, so dass neue ST mit allen zuvor sequenztypisierten Isolaten verglichen werden können (Spratt 1999; Aanensen and Spratt 2005).

Ein Nachteil der MLST ist, dass nur ein sehr kleiner Teil des Kern-Genoms betrachtet wird, dies führt zu einem relativ geringen Differenzierungsgrad, besonders bei wenig variablen Spezies. Dies bedeutet, dass zwei Isolate, die dem gleichen ST zugeordnet wurden, in anderen Genen durchaus differieren können, und keinesfalls Klone darstellen müssen. Dieses Problem ist jedoch bei einer so variablen Spezies wie *E. coli* zu vernachlässigen, da hier unterschiedliche Stämme meist auch unterschiedlichen STen zugeordnet werden können. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass zwei nicht verwandte Isolate das gleiche Allelprofil aufweisen (Spratt 1999).

Obwohl sich in der zentralen Datenbank schon Isolate von ca. 70 verschiedenen Wirtsspezies befinden, sind die des Menschen noch überrepräsentiert. Es wurden noch relativ wenige Isolate von Rind, Schwein, Hund und Katze sequenztypisiert, so von der Katze beispielsweise bisher (Aug. 2010) nur 22. Durch die MLST der 260 Isolate für dieses Promotionsvorhaben werden neue Alleltypen identifiziert, und so auch neue STen benannt. Dies führt zu einer weiteren Vervollständigung des *E. coli*-Stammbaumes und einer repräsentativeren Anzahl an Tierisolaten, und dadurch möglicher Weise zu einem besseren Verständnis der Mikroevolution von *E. coli*-Pathogenen dieser Spezies.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Bakterienstämme

3.1.1.1. Verwendete *E. coli*-Isolate

Es wurden insgesamt 260 *Escherichia coli*-Isolate von Hunden und Katzen (n = 139), Schweinen (n = 53) und Rindern (n = 68) gewonnen und untersucht. 92 dieser Isolate stammen von klinisch erkrankten Tieren mit einer Infektion des Urogenitaltraktes (UGT) (Hd/Kz: n = 69; Sw: n = 23), die restlichen 168 von Tieren mit einer Gastroenteritis (GE) (Hd/Kz: n = 70; Sw: n = 30; Rd: n = 68). Die Tiere waren laut Vorbericht nicht mit Antibiotika vorbehandelt. Für die Isolierung der Erreger wurden den erkrankten Tieren folgende Untersuchungsmaterialien entnommen. Bei Infektionen des Geschlechtsapparates wurden Tupfer-, bei Harnwegsinfektionen Urin- und bei GE Kotproben genommen. Da zahlreiche Erreger und Faktoren für eine GE verantwortlich sein können, wurden aus den Kotproben isolierte *E. coli* nur dann in die Untersuchung aufgenommen, wenn die entsprechenden Kolonien quantitativ dominierten. Die Stämme waren deutschlandweit in einem Zeitraum von Januar 2004 bis März 2006 im Rahmen des BfT-GermVet-Projektes „Antibiotika-Resistenz-Monitoring bei Tieren“ gesammelt und in einer vorangegangenen Studie phänotypisch auf Resistenzen gegen Antiinfektiva untersucht worden (Grobbel, Lubke-Becker et al. 2007; Schwarz, Alesik et al. 2007).

3.1.1.2. Referenz- und Kontrollstämme

Die Stämme IMT7, IMT11, IMT19, IMT204, IMT1200, IMT1716, IMT2470, IMT3838, IMT4830, IMT7920, IMT9260 sowie IMT9267 wurden als Positivkontrollen für den Nachweis der verschiedenen VAGe mittels PCR genutzt.

Stamm	Gen	Referenz
IMT7	<i>stx1, stx2, eaeA</i>	(Barth, Tscholshiew et al. 2007)
IMT11	<i>eltB-1, est-1</i>	(Barth, Tscholshiew et al. 2007)
IMT19	<i>est-1a, est-2, fedA, stx2e</i>	(Barth, Tscholshiew et al. 2007)
IMT204	<i>est-1a, fanA, fimF41</i>	(Barth, Tscholshiew et al. 2007)
IMT1200	<i>papG I, papG III, crlA, cnf1, sat, fyuA, mat, feoB</i>	(Ewers, Li et al. 2007)
IMT1716	Negativkontrolle für <i>est-1a, est-2, eltB-1, stx2e, faeG, fanA, fasA, fedA</i> und <i>fimF41</i>	(Schierack, Steinruck et al. 2006)
IMT2470	<i>papG II, chuA, ibeA, traT, sitD (chr.), GimB, iroN, ompA, sitD (epis.), astA, iss, irp2, papC, iucD, tsh, vat, colV</i>	(Ewers, Li et al. 2007)
IMT3838	<i>est-1a, fasA</i>	(Barth, Tscholshiew et al. 2007)
IMT4830	<i>est-2, eltB-1, faeG</i>	(Barth, Tscholshiew et al. 2007)
IMT7920	<i>fimC, iha, afa/draB, sfa/foc, RPai (malX)</i>	(Ewers, Li et al. 2007)
IMT9260	<i>crlA, ireA, tia, sat, fyuA, mat, feoB</i>	(Ewers, Li et al. 2007)
IMT9267	<i>kpsMTII, hlyA, pic, fimC, hrlA, neuC, RPai (malX), sfa/foc</i>	(Ewers, Li et al. 2007)

3.1.2. Geräte und Labormaterial

<u>Gerät / Material:</u>	<u>Bezugsfirma:</u>
96-Loch-Platten	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Elektrophoresekammern	AGS, Hybaid, MWG
Fluorometer DyNA Quant™ 200	Hoefer, Inc., Holliston, USA
Pipetten (2,5 bis 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (2,5 bis 1000µl)	SARSTEDT, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,2 – 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttlerapparat 3031	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sterilwerkbank Laminar Flow	Steag, Pliezhausen
Thermocycler 2720	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Transilluminator E.A.S.Y.	Herolab, Wiesloch
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Waage BP 2100	Sartorius AG, Göttingen
Wärmeschrank	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.3. Chemikalien

<u>Material:</u>	<u>Bezugsfirma:</u>
MasterPure Genomic DNA Purification Kit	Epicentre Biotechnologies, Oldendorf
Ethanol	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropanol	Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
RNAse	Epicentre Biotechnologies, Oldendorf

3.1.4. Lösungen

3.1.4.1 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer Stammlösung (10 x konz.)	Tris (890mM)	107,82 g
	Borsäure (890mM)	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8.0 (eingestellt mit NaOH)	18,62 g
		auf 100 ml davon 40 ml auf 1000 ml A. bidest.
Stop-Lösung	Formamid	9,50 ml
	EDTA-Lsg. pH 8,0 (500 mM)	0,40 ml
	Bromphenolblau	5,00 mg
	Xylencyanol FF	5,00 mg
	A. bidest.	0,10 ml
Agarose	Agarose ¹	1,00 – 1,50 g auf 100 ml 1 x TBE

Ethidiumbromidlösung 1 %

¹ BIODEAL, Markkleeberg

3.1.4.2. Lösungen für Polymerase-Kettenreaktion

10 x PCR-Puffer ¹	Tris-HCL pH 8,4	200 mM
	KCl	500 mM
Taq DNS-Polymerase ¹		5 U/μl
Magnesium Chlorid Solution		50 mM
dNTP ²	PCR Nucleotid Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 10 mM

¹ Biotherm, Rapidozym GmbH, Berlin

² Rapidozym GmbH, Berlin

3.1.5. Nährmedien

LB-Medium (Luria Broth)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
		pH 7,0 ± 0,2

autoklaviert bei 121°C, 15 Minuten

Blutagar	Pankreatisches Pepton (Fleisch)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Gelantine)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	5,00 g/l
	Eiweißhydrolysat	3,50 g/l
	Hefeextrakt	3,50 g/l
	NaCl	5,00 g/l
	Agar	10,00 g/l
		pH 7,0 ± 0,2

autoklaviert bei 121°C, 15 Minuten
abgekühlt auf 45 – 50°C
anschließend Zugabe von 5 % defibrinierten Schafblut

3.1.6. Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation

Die Primer wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, München bezogen. Die Primersequenzen sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

Tabelle 2: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung Virulenz-assoziiierter Gene (VAG)

Name	Primersequenz (5'-3')	Anlagerung (°C)	Primernamen	Länge des Amplifikats (bp)	Referenz
Gruppe II kapsuläre Antigene	CAGGTAGCGTGCAACTGTA CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	58 58	kpsMTIIF kpsMTIIR	280	Johnson und Stell 2000
Hämolysin A	GTCCATTGCCGATAAGTTT AAGTAATTTTTGCCGTTT	58 58	hlyAF hlyAR	352	Ewers et al. 2004
Serin Protease Autotransporter	ACTGGATCTTAAAGGCTCAGG TGGAATATCAGGGTGCCACT	58 58	picF picR	409	Ewers et al. 2007
Typ 1-Fimbrie	GGGTAGAAAAATGCCGATGGTG CGTCATTTTGGGGTAAGTGC	58 58	fimCF fimCR	477	Janßen et al. 2001
Hitzeresistente Agglutinin	TCACTTGCAGACCAAGCGTTTC GTAACACACTGCTGTACACCT	58 58	hriA/hekF hriA/hekR	537	Ewers et al. 2007
Iron-regulated-Gen-homologes Adhäsion	TAGTGCGTTGGGTTATCGCTC AAGCCAGAGTGGTTATTCGC	58 58	ihaF ihaR	609	Ewers et al. 2007
K1 kapsuläres Polysaccharid	GGTGGTACATTCGGGGATGTC AGGTGAAAAGCCCTGGTAGTGTC	58 58	neuCF neuCR	676	Watt et al. 2003
Afimbrial/ Dr antigen-spezifisches Adhäsion	TAAGGAAGTGAAGGAGCGGTG CCAGTAACTGTCCCGTGACA	58 58	afa/draBCF afa/draBCR	810	Ewers et al. 2007
Marker für Pathogenitätsinsel CFT073	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	58	Rpai (maIX)F	922	Johnson und Stell 2000

	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	58	Rpai (malX)R	
S fimbrie und F1C fimbrie	GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA	58	sfa/focF	1242 Ewers et al. 2007
	CGGAGAACTGGGTGCATCTTA	58	sfa/focR	
Häm Rezeptor Gen (<i>E. coli</i> / haem utilization)	GACGAACCAACGGTCAGGAT	58	chuAF	278 Clermont et al. 2000
	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	58	chuAR	
Invasion of brain endothelium	TGGAACCCGCTCGTAATATAC	58	ibeAF	342 Ewers et al. 2007
	CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	58	ibeAR	
Transfer Protein	GTGGTGCCGATGAGCACAG	58	traTF	430 Ewers et al. 2007
	TAGTTCACATCTTCCACCATCG	58	traTR	
Salmonella iron Transport System Gen	ACTCCCATACACAGGATCTG	58	sitD (chro)F	554 Ewers et al. 2007
	CTGTCTGTGTCGGGAATGA	58	sitD (chro)R	
genetische Insel assoziiert mit Neugeborenenmeningitis	TCCAGATTGAGCATATATCCC	58	gimBF	736 Ewers et al. 2007
	CCTGTAACATGTTGGCTTCA	58	gimBR	
Siderophor-Receptor	ATCCTCTGGTCGCTAACTG	58	iroNF	847 Ewers et al. 2007
	CTGCACTGGAAGAAGAACTGTTCT	58	iroNR	
Outer membrane protein	AGCTATCGCGATTGCAGTG	58	ompAF	919 Ewers et al. 2007
	GGTGTGCCAGTAACCCGG	58	ompAR	
Salmonella iron Transport System Gen	TTGAGAACGACAGCGACTTC	58	sitD (epis)F	1052 Ewers et al. 2007
	CTATCGAGCAGGTGAGGA	58	sitD (epis)R	
EAST1 (hitestabiles Zytotoxin)	TGCCATCAACACAGTATATCC	58	astAF	116 Yamamoto und Echeverria 1996
	TAGGATCCTCAGGTCCGGAG	58	astAR	
	TGACGGC			

Increased serum survival	ATCACATAGGATTCTGCCG CAGCGGAGTATAGATGCCA	58 58	issF issR	309	Ewers et al. 2005
Iron repressible protein (Yersiniabactin-Synthese)	AAGGATTGGCTGTACCGGAC TCGTGGGCAGCGTTTCTTCT	58 58	irp2F irp2R	413	Schubert et al. 1998
Pilus assoziiert mit Pyelonephritis	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTACATAAC	58 58	papCF papCR	501	Janßen et al. 2001
Strukturgen des Colicin V-Operon	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCCCATGCT	58 58	colVF colVR	598	Ewers et al. 2007
Aerobactin-Synthese	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC CCTGATCCAGATGATGCTC	58 58	iucDF iucDR	714	Janßen et al. 2001
Temperatur sensitives Hämagglutinin	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC CTCCGATGTTCTGAACGT	58 58	tshF tshR	824	Ewers et al. 2004
Vakuolisierendes Autotransporter- Toxin	TCCTGGGACATAAATGGCTAG GTGTCAGAACGGAAATTGTC	58 58	vatF vatR	981	Ewers et al. 2004
Curli fiber Gen	TTTTCGATTGTCTGGCTGTATG CTTCAGATTCAGCGTCGTC	58 58	criAF criAR	250	Maurer et al. 1998
Iron-responsive element (Siderophor- Receptor)	ATTGCCGTGATGTGTTCTGCG CAGGGATCACTTCAATGCGT	58 58	ireAF ireAR	384	Ewers et al. 2007
Cytotoxic necrotizing factor	TCGTTATAAAAATCAAACAGTG CTTTACAATATTGACATGCTG	58 58	cnf 1F cnf 1R	446	Ewers et al. 2004
Toxische Invasions-Locus in ETEC Stämmen	AGCGCTTCCGTCAGGACTT ACCAGCATCCAGATAGCGAT	58 58	tiaF tiaR	512	Ewers et al. 2007

Secreted autotransporter toxin	TGCTGGCTCTGGAGAAC	58	satF	667	Ewers et al. 2007
	TTGAACATTCAGAGTACCGGG	58	satR		
Ferric yersinia uptake (Yersiniabactin-Rezeptor)	GCGACGGGAAGCGATGACTTA	58	fyuAF	774	Schubert et al. 1998
	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	58	fyuAR		
Meningitis assoziierte und Temperatur regulierte Fimbrie	TATACGCTGGACTGAGTCGTG	58	matF	899	Ewers et al. 2007
	CAGGTAGCGTGAACCTGTA	58	matR		
ferrous iron transport system	CTTCACTGAAGAAAAGGTTACT	58	feoBF	523	Ewers et al. 2007
	ATAAAGCCTGACAATTCGTCTAA	58	feoBR		
Hitzestabiles Enterotoxin 2	TGCCTATGCATCTACACAAAT	55	ST-2F	113	Bosworth et al. 2003
	CTCCAGCAGTACCATCTCTA	55	ST-2R		
Hitzestabiles Enterotoxin 1	CAACTGAATCACTTGACTCTT	55	ST-1aF	158	Bosworth et al. 2003
	TTAATAACATCCAGCACAGG	55	ST-1aR		
Fimbrie F5	AATACTTGTTCCAGGGAGAAA	55	F5F	230	Bosworth et al. 2003
	AACITTTGGTTAAACTTCCT	55	F5R		
Hitzelabiles Enterotoxin 1	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	55	LT-1F	272	Bosworth et al. 2003
	TGGTCTCGGTCAGATATGT	55	LT-1R		
Fimbrie F18	TGGTAACGTATCAGCAACTA	55	F18F	313	Bosworth et al. 2003
	ACTTACAGTGCTATTCGACG	55	F18R		
Fimbrie F6	AAGTTACTGCCAGTCTATGC	55	F6F	409	Bosworth et al. 2003
	GTAACCTCACCGTTTGATC	55	F6R		
Fimbrie F4	GAATCTGTCCGAGAATATCA	55	F4F	499	Bosworth et al. 2003
	GTTGGTACAGGTCTTAATGG	55	F4R		
Fimbrie F41	AGTATCTGGTTCAGTGATGG	55	F41F	612	Bosworth et al. 2003

	CCACTATAAGAGGTTGAAGC	55	F41R	
Shiga-Toxin 2	AATAGTATACGGACAGCGAT	55	Stx-2eF	Bosworth et al. 2003
	TCTGACATTCTGGTTGACTC	55	Stx-2eR	
Intimin	ATATCCGTTTTTAATGGCTATCT	55	IntiminF	Franck et al. 1998
	AATCTTCTGCCGTACTGTGTTCA	55	IntiminR	(Franck, Bosworth et al. 1998)
Shiga-Toxin 1	TTCGCTCTGCAATAGGTA	55	Stx-1F	Franck et al. 1998
	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	55	Stx-1R	

Tabelle 3: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung ca. 550-950 bp langer Abschnitte der sieben Housekeeping-Gene des MLST-Schemas der University College Cork

Name	Primersequenz (5´-3´)	Anla- gerung (°C)	nachge- wiesenes Gen	Länge des Amplifi- kats (bp)	Referenz
Adenylat-Kinase	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	54	<i>adk</i>	583	*
Adenylat-Kinase	CCGTCAACTTTCGGGTATTT	54	<i>adk</i>	583	*
Fumarat-Hydratase	TCACAGGTCCGCAGCGCTTC	54	<i>fumC</i>	806	*
Fumarat-Hydratase	TCCCGGCAGATAAGCTGTGG	54	<i>fumC</i>	806	*
Gyrase B	TCGGCGACACGGATGACGGC	63	<i>gyrB</i>	911	*
Gyrase B	GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	63	<i>gyrB</i>	911	*
Isocitrat-Dehydrogenase	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCG GCACA	54	<i>icd</i>	878	*
Isocitrat-Dehydrogenase	GGACGCAGCAGGATCTGTT	54	<i>icd</i>	878	*
Malat-Dehydrogenase	ATGAAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCT GCTGGCGG	63	<i>mdh</i>	932	*
Malat-Dehydrogenase	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGG ATATCTTTCTT	63	<i>mdh</i>	932	*
Adenylosuccinat-Synthase	TCGGTAACGGTGTGTGCTG	56	<i>purA</i>	816	*
Adenylosuccinat-Synthase	CATACGGTAAGCCACGCAGA	56	<i>purA</i>	816	*
Recombinase	CGCATTCCGCTTTACCCTGACC	58	<i>recA</i>	780	*
Recombinase	AGCGTGAAGGTAAACCTGTG	58	<i>recA</i>	780	*

* = <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>

3.2. Methoden

3.2.1. Verwendete *E. coli*-Isolate

3.2.1.1. Isolierung von *E. coli*

Zur Identifizierung wurden die Isolate auf CHROMagar kultiviert. Die Spezies wurde bei jedem fünften Isolat mittels API 20E bestätigt.

3.2.1.2. Anzucht

Zur Anzucht wurden die bei -70°C gelagerten Stämme auf Blutagar ausgestrichen und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Einzelkolonien entnommen.

3.2.1.3. Asservierung

Zur Asservierung wurden Einzelkolonien in BHI Flüssigbouillon angezüchtet, mit 2% Glycerin in Nunc Cryo-Tubes gegeben und bei -70 °C gelagert.

3.2.2. O-Serotypisierung

Diese Typisierungsmethode, die nach wie vor standardmäßig für *E. coli* angewendet wird, diente der näheren Charakterisierung der *E. coli*-Isolate von Hunden und Katzen. Sie wurde von Frau Dr. Fruth vom Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger des Robert-Koch-Instituts, Wernigerode mittels Mikrotiterplatte und Gefäß-Agglutination mit Antiseren vom Kaninchen gegen *E. coli*-Teststämme der O-Serotypen 1-181 vorgenommen (Fruth 2005) (Prager, Strutz et al. 2003).

3.2.3. Aufreinigung der DNS

Zur Gewinnung der reinen DNS der Isolate wurden diese zunächst aus den Cryo-Tubes auf Blutagar übertragen und 24 Stunden bis zum Heranwachsen von Kolonien im Brutschrank bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden Einzelkolonien in flüssiges LB-Medium überimpft

und ebenfalls bei 37°C über Nacht im Schüttler bebrütet. Aus zwei Milliliter dieser Bakteriensuspension wurde anschließend mit dem MasterPure Genomic DNA Purification Kit der Firma Epicentre Biotechnologies entsprechend der Arbeitsanleitung DNA gewonnen.

3.2.4. Konzentrationsbestimmung der DNS

Zur Bestimmung der Konzentration der aufgereinigten DNS wurde das Fluorometer DyNA Quant™ 200 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco CA, USA) verwendet. Hierzu wurden zwei µl der zu messenden DNS-Lösung mit zwei ml einer Lösung mit dem Farbstoff „Hoechst 33258“ vermischt. Dieser Farbstoff lagert sich an die DNS-Doppelhelix an, wodurch es zu einer Änderung seines Emissionsspektrums kommt, dies führt bei der anschließenden UV-Bestrahlung der Lösung zur Emission einer bestimmten Menge Licht, die durch eine Fotозelle gemessen wird und proportional zur DNS-Konzentration ist. Anhand einer Eichkurve, die vorher mittels einer Standard-DNS bekannter Konzentration und eines Leerwertes erstellt wird, wird die Intensität des Lichtes in die DNS-Konzentration umgerechnet. Da sich der Farbstoff nur an DNS anlagert, kann das Ergebnis nicht durch RNS oder Protein verfälscht werden.

3.2.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, bei der mit Hilfe einer hitzestabilen DNS-Polymerase und einem Primerpaar, zwei ca. 20 bp langen Oligonukleotiden, die an eine komplementäre Sequenz eines DNS-Einzelstranges binden, DNS in vitro vervielfältigt wird. Hierzu wird zunächst der DNS-Doppelstrang durch Erhitzen auf 94-96°C zu Einzelsträngen denaturiert. Durch eine Senkung der Temperatur auf 50-65°C können sich daraufhin die Primer an die komplementären DNS-Stränge anlagern. Die Primersequenzen sind dabei so zu wählen, dass die Primer nur an einer Stelle des Genoms und am jeweils anderen DNS-Einzelstrang binden. Nach der Primeranlagerung werden diese bei ca. 70°C durch die Polymerase um etwa 500 Basen pro 30 Sekunden in 3'-Richtung verlängert. Durch 20 bis 40-fache Wiederholung dieses Temperaturzyklus, d. h. der Denaturierung, der Primeranlagerung sowie der Verlängerung (Elongation), wird der zwischen den beiden Primeranlagerungen liegende DNS-Abschnitt exponentiell vervielfältigt, da jeweils die Produkte des vorherigen Zyklus als Ausgangsstoffe des folgenden Zyklus dienen. Die PCRen für diese Studie wurden mit dem Thermocycler 2720 von Applied Biosystems durchgeführt, in den 96 Reaktionsansätze gleichzeitig eingesetzt werden können.

3.2.6. PCR zum Nachweis der Virulenz-assoziierten Gene (VAGe)

Es wurden sechs verschiedene Multiplex-PCRen (MP-PCR I – IV (Ewers, Li et al. 2007) und MP-PCR V und VI (Casey and Bosworth 2009) zum Nachweis von insgesamt 45 VAGe angewandt. Auf folgende VAGe wurde dabei getestet:

Multiplex-PCR:

	VAGe:
MP-PCR I	<i>kpsMTII, hlyA, pic, fimC, hrlA/hek, iha, neuC, afa/draBC, RPai (malX), sfa/foc</i>
MP-PCR II	<i>chuA, ibeA, traT, sitD (chromosomal), gimB, iroN, ompA, sitD (episomal)</i>
MP-PCR III	<i>astA, iss, irp2, papC, colV, iucD, tsh, vat</i>
MP-PCR IV	<i>crlA, ireA, cnf1, tia, sat, fyuA, mat, feoB</i>
MP-PCR V	<i>est-II, est-la, fanA, eltB-1, fedA, fasA, faeG, fimF41, stx2e</i>
MP-PCR VI	<i>stx2, est-la, eltB-1, fanA, fimF41, eaeA, stx1</i>

Reaktionsansatz für die Multiplex-PCRen I bis IV:

	2,5 µl	PCR-Puffer
	2,0 µl	MgCl ₂ (50 mM)
	0,5 µl	dNTP (je 10 mM)
	0,8 µl	Primermix (je 100 pmol)
	0,1 µl	Taq DNS-Polymerase (1 unit)
	3,0 µl	aufgereinigte DNS (20 ng/µl)
ad	25,0 µl	A. bidest.

Das Thermocyclerprogramm begann mit einer Prädenaturierung bei 94°C über drei Minuten, gefolgt von 25 Zyklen, die jeweils aus einer Denaturierung bei 94°C über 30 Sekunden, einer Primeranlagerung bei 58°C ebenfalls über 30 Sekunden und einer dreiminütigen Amplifizierung bei 68°C bestanden. Anschließend folgte nach dem letzten Zyklus eine Endelongation bei 72°C über zehn Minuten.

Reaktionsansatz für die Multiplex-PCRen V bis VI:

	3,0 µl	PCR-Puffer
	1,2 µl	MgCl ₂ (50 mM)
	0,4 µl	dNTP (je 10 mM)
	3,0 µl	Primermix (je 100 pmol)
	0,1 µl	Taq DNS-Polymerase (1 unit)
	3,0 µl	aufgereinigte DNS (20 ng/µl)
ad	30,0 µl	A. bidest.

Für diese MP-PCRen wurde folgendes Thermocyclerprogramm verwendet:

Nach einer fünfminütigen Prädenaturierung bei 94°C folgten 25 Zyklen mit jeweils einer Minute Denaturierung bei 94°C, einer Minute Primeranlagerung bei 55°C sowie 90 Sekunden Amplifizierung bei 72°C. Die an den letzten Zyklus anschließende Endelongation bei 72°C dauerte fünf Minuten.

3.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäurestränge (RNS oder DNS) nach ihrer Größe getrennt und diese durch Vergleich mit DNS-Strängen bekannter Größe bestimmt. Hierzu werden die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle mit Hilfe einer elektrischen Spannung durch ein Netz von Agarosepolymeren in Richtung positiv geladener Anode gezogen. Je kleiner die Moleküle sind, desto schneller können sie durch die Poren dieses Netzes wandern, d.h. je länger die Nukleinsäuremoleküle wandern, desto größer wird der Abstand zwischen den verschiedenen Größen.

Sechs Gramm Agarose wurden durch Aufkochen in 400 ml 1 x TBE-Puffer gelöst. Nach einer Abkühlung auf ca. 60°C wurden 8 µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Anschließend wurde die flüssige Agarose in eine Gelkammer mit einem Probenaschenkamm mit 24 Taschen gegossen. Nach Aushärtung durch Abkühlung wurde das Gel so in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TBE-Laufpuffer gelegt, dass die Probenaschen auf der Seite der Kathode lagen, und dann der Kamm entfernt. In 23 Taschen wurden je 5 µl einer aufzutrennenden DNS-Probe, die zuvor mit 2 µl Stop-Puffer vermischt wurden, gegeben, sowie in eine der Taschen ein 100 bp Marker. Durch den Stop-Puffer wird die spezifische Dichte der Probe höher als die des Laufpuffers, wodurch die Probe in der Tasche verbleibt. Nach einer Laufzeit von 30 Minuten bis 1,5 Stunden in einem elektrischen Feld von 120 V wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und im Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt. Durch das im Gel befindliche Ethidiumbromid, das

durch Anlagerung an doppelsträngige DNS im UV-Licht fluoresziert, wurden die einzelnen Amplifikate sichtbar und konnten fotografisch zur späteren Auswertung festgehalten werden.

3.2.8. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

3.2.8.1. Prinzip

Zur MLST werden von jedem *E. coli*-Isolat in der Regel sieben Housekeeping-Gene bzw. ca. 500 bis 850 bp lange Abschnitte dieser Gene mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenzanalysiert.

Housekeeping-Gene sind hoch konserviert, da eine Mutation, die den Austausch einer Aminosäure bewirkt, meist zum Funktionsverlust eines lebenswichtigen Enzyms führt.

Je nach Sequenz können diese Gene anhand der Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) bestimmten Alleltypen, die in der Reihenfolge ihres Nachweises durchnummeriert wurden, zugeordnet werden.

Die Kombination dieser sieben Nummern (Allelprofil) ergibt einen Sequenztyp (ST). Ähnliche STen werden weiterhin zu ST-Komplexen zusammengefasst. Diese bestehen nach der University College Cork aus mindestens drei verschiedenen STen, die sich jeweils von mindestens einem anderen ST aus dem entsprechenden Komplex nur in einem Alleltyp unterscheiden.

3.2.8.2. Datenbank

Für dieses Promotionsvorhaben wurden die Gene genutzt, auf denen die *E. coli* MLST-Datenbank der University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) beruht. Dies sind die Gene *adk* (Adenylat-Kinase), *icd* (Isocitrat-Dehydrogenase), *fumC* (Fumarat-Hydratase), *mdh* (Malat-Dehydrogenase), *gyrB* (Gyrase B), *purA* (Adenylosuccinat-Synthase) und *recA* (Rekombinase).

Die MLST-Datenbank enthält zur Zeit (Aug 2010) bereits ca. 3.100 *E. coli*-Isolate von den verschiedensten Wirten, Erkrankungen und Ländern, das heißt, dass die im Rahmen dieser Studie untersuchten Isolate vor dem Hintergrund der gesamten *E. coli*-Population dargestellt und phylogenetisch eingeordnet werden konnten.

3.2.8.3. PCR zur Amplifizierung der Genabschnitte für die MLST

Reaktionsansatz für alle sieben PCRen:

	6,0 µl	PCR-Puffer
	3,4 µl	MgCl ₂ (50 mM)
	0,7 µl	dNTP (je 10 mM)
	1,2 µl	Primer (je 10 pmol)
	0,1 µl	Taq DNS-Polymerase (1 unit)
	3,0 µl	aufgereinigte DNS (20 ng/µl)
ad	60,0 µl	A. bidest.

Das Thermocyclerprogramm begann mit einer Prädenaturierung bei 95°C über zwei Minuten, gefolgt von 30 Zyklen, die jeweils aus einer 30sekündigen Denaturierung bei 95°C, einer ebenfalls 30sekündigen Primeranlagerung bei je nach Primer 54°C bis 63°C (s. Tabelle 1) und einer einminütigen Amplifizierung bei 72°C bestanden. Anschließend folgte nach dem letzten Zyklus eine Endelongation bei 72°C über fünf Minuten.

3.2.8.4. Darstellung der Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Amplifizierung der Genabschnitte wurden zur Kontrolle der Reinheit, d.h. der Abwesenheit unspezifischer PCR-Produkte, 5 µl aus dem PCR-Ansatz entnommen, mit 2 µl STOP-Puffer vermischt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V für 45 Minuten durchgeführt. Zeigte sich anschließend eine einzelne Bande auf der jeweils richtigen Höhe und mit ausreichender Intensität, konnte der Rest des entsprechenden Amplifikats zur Sequenzanalyse geschickt werden.

3.2.8.5. DNS-Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurden die Amplifikate zur AGOWA GmbH in Berlin geschickt. Hierzu mussten diese sehr rein sein, d.h. bei der Gelelektrophorese eines Teils des Amplifikats durften keine weiteren Banden sichtbar sein. Die von der AGOWA GmbH ermittelten Sequenzdaten wurden zur weiteren Analyse als Dateien mit entsprechenden Signal-Kurven (Signale der einzelnen Basen) übertragen.

3.2.8.6. Computergestützte Analyse der MLST-Daten

Die Bearbeitung der von AGOWA erhaltenen Sequenzierungsdaten erfolgte mit dem EDV-Programm Genome Assembly Program (Gap4). Nach visueller Kontrolle der Traces, in denen die Signalstärke einer bestimmten Base für jede einzelne Stelle der Sequenz mittels einer Kurve dargestellt wird, wurden die Sequenzen des Vorwärts- und des Rückwärtsstranges übereinander gelegt und auf die für die MLST benötigte Länge gekürzt (s. Tabelle 1). Durch Eingabe der erhaltenen Sequenzen auf die MLST-Homepage (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) konnte der entsprechende Alleltyp, sowie nach Eingabe des gesamten Allelprofils, der ST des untersuchten Isolates ermittelt werden.

3.2.9. Statistische Auswertung

Die statischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 18.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte als Mittelwerte.

Die kategorisierten Daten dagegen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests, bzw. des exakten Tests nach Fisher ausgewertet. Bei Verwendung des Chi-Quadrat-Tests wurden die erforderlichen Testvoraussetzungen erfüllt, so dass bei allen Tests überwiegend weniger als 20% der erwarteten Häufigkeit kleiner 5 war. In den Fällen, in denen diese Testvoraussetzung nicht gegeben war, wird dies jeweils bei der Ergebnisdarstellung erläutert.

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $> 0,05$ als statistisch nicht signifikant (-), $\leq 0,05$ als statistisch signifikant (+), $\leq 0,01$ als sehr signifikant (++) und $\leq 0,001$ als höchst signifikant (+++) angenommen wurde. Ein p-Wert $\leq 0,2$ wurde als deutlicher Trend (!) interpretiert.

4. Ergebnisse

4.1. O-Serotypisierung

4.1.1. O-Serotypen der *E. coli*-Isolate vom Kleintier

Tabelle 4: Relative Häufigkeit der O-Serotypen¹ bei 139 Isolaten von Hunden und Katzen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 69) bzw. Gastroenteritis (GE) (n = 70)

O-Gruppe	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ² der Unterschiede
	Kleintier / UGTI	Kleintier / GE	
O2	0,0 %	18,8 %	+++
O6	13,0 %	23,2 %	!
O18	18,8 %	1,4 %	+++
O21	2,9 %	5,8 %	-
O22	5,8 %	4,3 %	-
O25	4,3 %	5,8 %	-
O74	13,0 %	0,0 %	++
Orauh	7,2 %	7,2 %	-
Andere	35,0 %	33,5 %	

¹ = dargestellt nur O-Serotypen, die mindestens viermal nachgewiesen werden konnten

² = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den beiden Habitaten

Unter den 139 Isolaten wurden 23 Serotypen gefunden, jedoch über 60 % der Stämme gehörten zu einem von acht Serotypen (O2, O4, O6, O18, O21, O22, O25, O74) (Tabelle 4). Der am stärksten vertretene Serotyp war der Serotyp O6, diesem konnten 18 % aller Isolate von Hunden und Katzen zugeordnet werden (13 % Urogenitaltrakt (UGT); 23,2 % Gastrointestinaltrakt (GIT)). Den zweit- und dritthäufigsten Serotyp stellten die Serotypen

O18 mit 10,1 % (UGT: 18,8 %; GIT: 1,4 %) bzw. O2 mit 9,4 % (UGT: 0 %; GIT: 18,8 %) dar. 20,1 % (n = 28) der Stämme waren nicht typisierbar.

4.1.1.1. Vergleich der Serotypen der *E. coli*-Isolate aus dem GIT und dem UGT

Wie in Tabelle 4 dargestellt, wurden von den sieben häufigsten O-Serotypen bei den Isolaten vom Kleintier zwei (O18 und O74) signifikant häufiger im UGT, sowie eine häufiger im GIT nachgewiesen. Die übrigen vier kamen in beiden Habitaten, UGT und GIT in einer ähnlichen Frequenz vor. Der exakte Signifikanz-Test nach Fisher wies bei den O-Serotypen O21, O22, O25 sowie O74 auf Grund der geringen Zahl positiver Fälle eine eingeschränkte Validität auf, dennoch ist beim Vergleich der Daten von der Richtigkeit des Ergebnisses auszugehen. Der bei Urogenitaltraktinfektionen (UGTI) häufigste Serotyp O18 (18,8 %) sowie der zusammen mit O6 zweithäufigste Typ O74 (13 %) waren bis auf eine Ausnahme für diese Erkrankung exklusiv. Gleiches gilt für den bei GE mit 18,8 % zweithäufigsten O-Serotyp O2. Die bei dieser Erkrankung mit 23,2 % am häufigsten nachgewiesene Gruppe O6, zeigte jedoch im UGT ebenfalls eine hohe Prävalenz (13 %).

4.2. Virulenzgenotypisierung

4.2.1. Virulenz-assoziierte Gene der *E. coli*-Isolate vom Kleintier

Bei den 69 *E. coli*-Isolaten von Hunden und Katzen mit UGTI sowie den 70 Isolaten von Kleintieren mit Gastroenteritis (GE) wurden für die 34 verschiedenen ExPEC-assoziierten Virulenzfaktoren Prävalenzen zwischen 0 % und 100 % nachgewiesen (Tabelle 5). Nicht vorhanden waren die Adhäsion-Gene *afa/dra* und *tsh* sowie das Toxin-Gen *astA* bei den UGTI-Isolaten sowie das Toxin-Gen *cnf 1* bei den GE-Isolaten. Das Adhäsion-Gen *fimC* konnte bei den UGTI-Isolaten sowie das Protektin-Gen *ompA*, die Adhäsion-Gene *mat* und *feoB* sowie das Adhäsion-assoziierte Regulator-Gen *crlA* bei den GE-Isolaten zu 100 % nachgewiesen werden. Bei den übrigen Isolaten vom Kleintier kamen diese Virulenz-assoziierten Gene (VAGe), mit Ausnahme des Adhäsion-Gens *crlA*, jedoch mit ähnlich hoher Prävalenz vor (*fimC* bei GE: 98,6 %; *ompA*, *mat*, und *feoB* bei UGTI: 94,2 %, 97,1 %, und 94,2 %). Dagegen verfügten unter den Isolaten beider Erkrankungen sehr wenige über die VAGe *tsh* (GE: 1,4 %; UGTI: 0 %), *astA* (GE: 8,6 %; UGTI: 0 %), *iha* (GE: 7,1 %; UGTI: 7,2 %) und das Virulenz-Plasmid-(colV)-assoziierte Operon-Gen *cvi/cva* (GE: 4,3 %; UGTI: 10,1 %).

Bei keinem der 69 *E coli*-Isolate von Kleintieren mit UGTI konnte eines der fünf Enterotoxin-Gene, auf die getestet wurde, nachgewiesen werden. Nur jeweils vier der GE-Isolate (5,7 %) waren positiv für die Gene des Hitzestabile Enterotoxin 1 (ST-1) bzw. des Intimins (Tabelle 10).

Tabelle 5: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Hunden und Katzen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 69) bzw. mit Gastroenteritis (GE) (n = 70)

Gen	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Kleintier / UGTI	Kleintier / GE	
Adhäsine			
<i>afa/draBC</i>	0,0 %	1,4 %	-
<i>crlA</i>	63,8 %	100,0 %	+++
<i>hrlA/hek</i>	81,2 %	72,9 %	-
<i>fimC</i>	100,0 %	98,6 %	-
<i>iha</i>	7,2 %	7,1 %	-
<i>papC</i>	66,7 %	54,3 %	-
<i>sfa/foc</i>	75,4 %	70,0 %	-
<i>tsh</i>	0,0 %	1,4 %	-
<i>mat</i>	97,1 %	100,0 %	-
Eisenaquisitionssysteme			
<i>fyuA</i>	69,6 %	74,3 %	-
<i>chuA</i>	88,4 %	58,6 %	+++
<i>feoB</i>	94,2 %	100,0 %	-
<i>sitD</i> (epis)	14,5 %	8,6 %	-
<i>sitD</i> (chro)	50,7 %	65,7 %	-
<i>ireA</i>	29,0 %	27,1 %	-
<i>iroN</i>	78,3 %	82,9 %	-
<i>irp2</i>	88,4 %	74,3 %	+
<i>iucD</i>	15,9 %	17,1 %	-
Serumresistenz			
<i>colV</i>	10,1 %	4,3 %	-
<i>iss</i>	8,7 %	11,4 %	-
<i>neuC</i>	13,0 %	15,7 %	-

Tabelle 5: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Hunden und Katzen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 69) bzw. mit Gastroenteritis (GE) (n = 70)

Gen	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Kleintier / UGTI	Kleintier / GE	
<i>kpsMTII</i>	52,2 %	55,7 %	-
<i>ompA</i>	94,2 %	100,0 %	-
<i>traT</i>	31,9 %	24,3 %	-
Toxine			
<i>cnf 1</i>	36,2 %	0,0 %	+++
<i>astA</i>	0,0 %	8,6 %	+
<i>sat</i>	24,6 %	8,6 %	+
<i>vat</i>	59,4 %	70,0 %	-
<i>hlyA</i>	68,1 %	70,0 %	-
Invasine			
<i>gimB</i>	15,9 %	12,9 %	-
<i>ibeA</i>	29,0 %	22,9 %	-
<i>tia</i>	21,7 %	8,6 %	+
<i>Rpai (malX)</i>	85,5 %	80,0 %	-
<i>pic</i>	34,8 %	47,1 %	-

¹ = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den beiden Habitaten

4.2.1.1. Vergleich der VAGe der *E. coli*-Isolate aus dem GIT und dem UGT von Hund und Katze

Bei den 139 Isolaten von Hunden und Katzen ließ sich nur für wenige Virulenzfaktoren eine deutlich höhere Prävalenz für eine der beiden Erkrankungen erkennen (Tabelle 5). Exklusiv für die Erreger der UGTI war das Toxin-Gen *cnf 1*, mit einer Prävalenz von 0% bei Isolaten von Kleintieren mit einer GE und 36,2 % bei Isolaten von an einer UGTI erkrankten Kleintieren. Nur für sieben VAGe konnte ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz zwischen den beiden Habitaten nachgewiesen werden. Höchst signifikant war das häufigere

Vorkommen von *cnf 1* und *chuA* bei den Isolaten aus dem UGT sowie von *crlA* bei den Isolaten aus dem GIT.

4.2.2. Virulenz-assoziierte Gene der *E. coli*-Isolate vom Schwein

Auch bei den von Schweinen isolierten Stämmen konnten für die 34 ExPEC-assoziierten Gene bei den beiden Erkrankungen UGTI und GE Prävalenzen zwischen 0% und 100% nachgewiesen werden (Tabelle 6). Die bei den 53 Isolaten vom Schwein (GE: n = 30; UGTI: n = 23) am häufigsten nachgewiesenen VAGe waren *crlA*, *ompA* und *feoB* mit jeweils 100 % bei beiden Erkrankungen, gefolgt von *mat* (GE: 90 %; UGTI: 73,9 %) und *fimC* (GE: 63,3 %; UGTI: 91,3 %). Mit 60 % (GE) bzw. 52,2 % kam *traT* ebenfalls bei den Isolaten beider Habitats häufig vor. Dagegen wurden *afa/draBC*, *gimB*, *sat*, *tia*, *ireA* und *iha* gar nicht, sowie *vat* (GE: 0 %; UGTI: 4,3 %), *papC* (GE: 3,3 %; UGTI: 4,3 %), *sitD* (chromosomal) (GE: 0 %; UGTI: 4,3 %), *pic* (GE: 0 %; UGTI: 8,7 %) und *ibeA* (GE: 0 %; UGTI: 4,3 %) nur sehr selten nachgewiesen.

Für die elf getesteten mit Durchfall erregenden *E. coli* (InPEC)-assoziierten Virulenzfaktoren konnten bei den Isolaten von Schweinen mit GE Prävalenzen von bis zu 50 % festgestellt werden (Tabelle 7). Mit Ausnahme des Gens für das Shiga-Toxins 1 kamen alle getesteten Enterotoxin-Gene mit Prävalenzen zwischen 23,3 % und 50 % vermehrt vor. Am häufigsten nachgewiesen wurden die Gene für das hitzelabile Enterotoxin 1 (50 %) sowie für das Hitzestabile Enterotoxin 2 (46,7 %). Von den Genen der darmspezifischen Fimbrien kamen nur die Gene für F4 (46,7 %) und F18 (26,7 %) vermehrt vor.

Bei den Isolaten von Schweinen mit UGTI konnte keines dieser elf VAGe nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Schweinen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 23) bzw. mit Gastroenteritis (GE) (n = 30)

Gen	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Schwein / GE	
Adhäsine			
<i>afa/draBC</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>crlA</i>	100,0 %	100,0 %	
<i>hrlA/hek</i>	17,4 %	23,3 %	-

Tabelle 6: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Schweinen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 23) bzw. mit Gastroenteritis (GE) (n = 30)

Gen	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Schwein / GE	
<i>fimC</i>	91,3 %	63,3 %	+
<i>iha</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>papC</i>	4,3 %	3,3 %	-
<i>sfa/foc</i>	4,3 %	13,3 %	-
<i>tsh</i>	13,0 %	0,0 %	!
<i>mat</i>	73,9 %	90,0 %	!
Eisenaquisitionssysteme			
<i>fyuA</i>	30,4 %	0,0 %	++
<i>chuA</i>	8,7 %	20,0 %	-
<i>feoB</i>	100,0 %	100,0 %	
<i>sitD</i> (epis)	43,5 %	6,7 %	++
<i>sitD</i> (chro)	4,3 %	0,0 %	-
<i>ireA</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>iroN</i>	34,8 %	6,7 %	+
<i>irp2</i>	30,4 %	0,0 %	++
<i>iucD</i>	39,1 %	6,7 %	++
Serumresistenz			
<i>colV</i>	26,1 %	3,3 %	+
<i>iss</i>	39,1 %	0,0 %	+++
<i>neuC</i>	26,1 %	0,0 %	++
<i>kpsMTII</i>	26,1 %	20,0 %	-
<i>ompA</i>	100,0 %	100,0 %	
<i>traT</i>	52,2 %	60,0 %	-
Toxine			
<i>cnf 1</i>	17,4 %	0,0 %	+
<i>astA</i>	8,7 %	26,7 %	!
<i>sat</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>vat</i>	4,3 %	0,0 %	-
<i>hlyA</i>	8,7 %	63,3 %	+++

Tabelle 6: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Schweinen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 23) bzw. mit Gastroenteritis (GE) (n = 30)

Gen	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Schwein / GE	
Invasine			
<i>gimB</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>ibeA</i>	4,3 %	0,0 %	-
<i>tia</i>	0,0 %	0,0 %	
Adhäsine			
<i>Rpai (malX)</i>	4,3 %	10,0 %	-
<i>pic</i>	8,7 %	0,0 %	!

¹ = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den beiden Habitaten

4.2.2.1. Vergleich der VAGe der *E. coli*-Isolate aus dem GIT und dem UGT des Schweins

Beim Vergleich der Prävalenzen der VAGe der 30 Isolate von an einer GE erkrankter Schweine mit denen der 23 Isolate von an UGTI erkrankter Schweine war auffällig, dass acht der 34 ExPEC-assoziierten Gene (23,2 %) häufiger im GIT als im UGT nachzuweisen waren. Dies waren unter Anderem *hlyA* (GE: 63,3 %; UGTI: 8,7 %), *astA* (GE: 26,7 %; UGTI: 8,7 %) und *chuA* (GE: 20 %; UGTI: 8,7 %) (Tabelle 6). Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Kleintier (Tabelle 5) zeigten sich beim Schwein deutliche Unterschiede im Muster der VAGe zwischen Isolaten aus dem GIT und dem UGT. Sehr bis höchst signifikant waren diese unter den ExPEC-assoziierten Genen bei *hlyA*, *iss*, *neuC*, *sitD* (episomal), *irp2*, *iucD* und *fyuA*. Viele der ExPEC-assoziierten Gene kamen bei den GE-Isolaten, trotz hoher Prävalenzen bei den UGTI-Isolaten, nicht vor. Unter Anderem das Gen für den Zytonekrosefaktor 1 (UGTI: 17,4 %). Nicht signifikant waren die Unterschiede in den Prävalenzen der VAGe zwischen den beiden Habitaten, bis auf wenige Ausnahmen, nur bei den VAGen, die entweder bei allen oder bei keinem der Isolate vorkamen, oder auf die so wenige Isolate positiv getestet wurden, dass die Validität des exakten Signifikanz-Tests nach Fisher zu gering war. Bei näherer Betrachtung der Daten lässt sich jedoch erkennen, dass die Unterschiede mit zwei-

bis dreimal so hohen Prävalenzen bei den UGT-Isolaten wie bei den GIT-Isolaten auch hier deutlich sind (z.B. *sfa/foc*: UGTI: 4,3 %; GE: 13,3 %; *chuA*: UGTI: 8,7 %; GE: 20,0 %; *ibeA*: UGTI: 4,3 %; GE: 0,0 %). Insgesamt trugen die Isolate aus dem UGT wie erwartet wesentlich mehr ExPEC-assoziierte Gene als die Isolate aus dem GIT.

Ganz deutlich wurden die Unterschiede zwischen den Isolaten aus dem UGT und denen aus dem GIT aber bei der Betrachtung der Prävalenzen der mit Durchfall erregenden *E. coli* (InPEC)-assoziierten Gene, die für das Habitat GIT mit Prävalenzen von bis zu 50 % exklusiv waren (Tabelle 7). Entweder konnten diese VAGe bei keinem der Isolate gefunden werden oder die Unterschiede waren bis auf eine Ausnahme sehr bis höchst signifikant.

Tabelle 7: Relative Häufigkeit der 11 getesteten InPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Schweinen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 23) bzw. mit Gastroenteritis (GE) (n = 30)

Toxin / Fimbrie	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Schwein / GE	
<i>est-II</i>	0,0 %	46,7 %	+++
<i>est-Ia</i>	0,0 %	26,7 %	++
<i>fanA</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>eltB-1</i>	0,0 %	50,0 %	+++
<i>fedA</i>	0,0 %	26,7 %	++
<i>fasA</i>	0,0 %	3,3 %	-
<i>faeG</i>	0,0 %	46,7 %	+++
<i>fimF41</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>stx2e</i>	0,0 %	23,3 %	++
<i>eaeA</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>stx1</i>	0,0 %	0,0 %	

¹ = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den beiden Habitaten

4.2.3. Virulenz-assoziierte Gene der *E. coli*-Isolate vom Rind

Auch wenn einige der ExPEC-assoziierten Virulenzfaktoren bei den 68 Isolaten von Rindern mit GE wie erwartet eine niedrige Prävalenz aufwiesen, waren jedoch viele der Daten, die für *E. coli*-Isolate aus diesem Habitat gewonnen wurden, überraschend hoch. So konnten zum Beispiel die Gene für die Eisenakquisitionssysteme *sitD* (episomal) und *iucD* mit 69,1 bzw. 61,8 % relativ häufig nachgewiesen werden, sowie *traT* (77,9 %), *papC* (35,3 %), *colV* (17,6 %), *iss* (14,7 %), und *tsh* (7,4 %) (Tabelle 8).

Hingegen waren die Prävalenzen für die InPEC-assoziierten Virulenzfaktoren unerwartet niedrig. Die hier am häufigsten nachgewiesenen VAGe waren die Gene für F5 sowie für das Hitzestabile Enterotoxin 1 mit jeweils 8,8 % (Tabelle 10). Außer diesen wurden nur für die Gene für F41, Intimin sowie das Hitzestabile Enterotoxin 2 positive Isolate gefunden (5,9, 4,4 bzw. 1,5 %).

Tabelle 8: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Rindern mit Gastroenteritis (GE) (n = 68)

Gen	Wirt / Erkrankung
	Rind / GE
Adhäsine	
<i>afa/draBC</i>	0,0 %
<i>crlA</i>	100,0 %
<i>hrlA/hek</i>	75,0 %
<i>fimC</i>	82,4 %
<i>iha</i>	0,0 %
<i>papC</i>	35,3 %
<i>sfa/foc</i>	1,5 %
<i>tsh</i>	7,4 %
<i>mat</i>	89,7 %
Eisenaquisitionssysteme	
<i>fyuA</i>	30,9 %
<i>chuA</i>	16,2 %
<i>feoB</i>	98,5 %
<i>sitD</i> (epis)	69,1 %

Tabelle 8: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Rindern mit Gastroenteritis (GE) (n = 68)

Gen	Wirt / Erkrankung
	Rind / GE
<i>sitD</i> (chro)	00,0 %
<i>ireA</i>	14,7 %
<i>iroN</i>	20,6 %
<i>irp2</i>	29,4 %
<i>iucD</i>	61,8 %
Serumresistenz	
<i>colV</i>	17,6 %
<i>iss</i>	14,7 %
<i>neuC</i>	0,0 %
<i>kpsMTII</i>	4,4 %
<i>ompA</i>	98,5 %
<i>traT</i>	77,9 %
Toxine	
<i>cnf 1</i>	0,0 %
<i>astA</i>	13,2 %
<i>sat</i>	0,0 %
<i>vat</i>	1,5 %
<i>hlyA</i>	7,4 %
Invasine	
<i>gimB</i>	0,0 %
<i>ibeA</i>	2,9 %
<i>tia</i>	10,3 %
<i>Rpai</i> (<i>malX</i>)	2,9 %
<i>pic</i>	1,5 %

4.2.4. Vergleich aller *E. coli*-Isolate aus dem Gastrointestinaltrakt

Beim Vergleich der Virulenzmuster aller Isolate aus dem GIT lassen sich für diese deutliche, meist höchst signifikante Unterschiede zwischen den Spezies erkennen (Tabellen 9 und 10). So konnten besonders die VAGe *sit* (chromosomal) (Rd: 0 %; Sw: 0 %; KT: 65,7 %), *vat* (Rd: 1,5 %; Sw: 0 %; KT: 70 %), *RPai* (*malX*) (Rd: 2,9 %; Sw: 10 %; KT: 80 %), *pic* (Rd: 1,5 %; Sw: 0 %; KT: 47,1 %) sowie *neuC* (Rd: 0 %; Sw: 0 %; KT: 15,7 %) wesentlich häufiger bei Isolaten vom Kleintier als bei Isolaten vom Großtier nachgewiesen werden. Umgekehrte Verhältnisse fanden sich bei den VAGen *traT* (Rd: 77,9 %; Sw: 63,3 %; KT: 24,3 %) und *sitD* (episomal) (Rd: 69,1 %; Sw: 10 %; KT: 8,6 %), die bei den Isolaten vom Großtier häufiger vorkamen, sowie dem VAG *iucD* (Rd: 61,8 %; Sw: 10 %; KT: 17,1 %), welches bei einem wesentlich größeren Anteil der Isolate vom Rind gefunden wurde als bei den Isolaten der anderen Spezies. Die größten Unterschiede zwischen den Isolaten der beiden Nutztierarten tauchten bei den Genen *hlyA* (Rd: 7,4 %; Sw: 63,3 %), *kpsMTII* (Rd: 4,4 %; Sw: 20 %) und *astA* (Rd: 13,3 %; Sw: 26,7 %) auf, welche eine zwei- bis achtfach höhere Prävalenz bei den Isolaten vom Schwein als bei den Isolaten vom Rind zeigten, sowie bei den Genen *sitD* (episomal) (Rd: 69,1 %; Sw: 10 %), *hrlA/hek* (Rd: 75 %; Sw: 26,7 %), *irp2* (Rd: 29,4 %; Sw: 0 %) und *papC* (Rd: 35,3 %; Sw: 3,3 %), bei denen die Prävalenzen für die Isolate vom Rind wesentlich höher waren.

Tabelle 9: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Hunden und Katzen (n = 70), Schweinen (n = 30) bzw. Rindern (n = 68) mit Gastroenteritis (GE)

Gen	Wirt / Erkrankung			Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / GE	Kleintier / GE	Rind / GE	
Adhäsine				
<i>afa/draBC</i>	0,0 %	1,4 %	0,0 %	-
<i>crlA</i>	100,0 %	100,0 %	100,0 %	
<i>hrlA/hek</i>	23,3 %	72,9 %	75,0 %	+++
<i>fimC</i>	63,3 %	98,6 %	82,4 %	+++
<i>iha</i>	0,0 %	7,1 %	0,0 %	+

Tabelle 9: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Hunden und Katzen (n = 70), Schweinen (n = 30) bzw. Rindern (n = 68) mit Gastroenteritis (GE)

Gen	Wirt / Erkrankung			Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / GE	Kleintier / GE	Rind / GE	
<i>papC</i>	3,3 %	54,3 %	35,3 %	+++
<i>sfa/foc</i>	13,3 %	70,0 %	1,5 %	+++
<i>tsh</i>	0,0 %	1,4 %	7,4 %	!
<i>mat</i>	90,0 %	100,0 %	89,7 %	+
Eisenaquisitionssysteme				
<i>fyuA</i>	0,0 %	74,3 %	30,9 %	+++
<i>chuA</i>	20,0 %	58,6 %	16,2 %	+++
<i>feoB</i>	100,0 %	100,0 %	98,5 %	-
<i>sitD</i> (epis)	6,7 %	8,6 %	69,1 %	+++
<i>sitD</i> (chro)	0,0 %	65,7 %	0,0 %	+++
<i>ireA</i>	0,0 %	27,1 %	14,7 %	++
<i>iroN</i>	6,7 %	82,9 %	20,6 %	+++
<i>irp2</i>	0,0 %	74,3 %	29,4 %	+++
<i>iucD</i>	6,7 %	17,1 %	61,8 %	+++
Serumresistenz				
<i>colV</i>	3,3 %	4,3 %	17,6 %	+
<i>iss</i>	0,0 %	11,4 %	14,7 %	!
<i>neuC</i>	0,0 %	15,7 %	0,0 %	+++
<i>kpsMTII</i>	20,0 %	55,7 %	4,4 %	+++
<i>ompA</i>	100,0 %	100,0 %	98,5 %	-
<i>traT</i>	60,0 %	24,3 %	77,9 %	+++
Toxine				
<i>cnf 1</i>	0,0 %	0,0 %	0,0 %	
<i>astA</i>	26,7 %	8,6 %	13,2 %	!
<i>sat</i>	0,0 %	8,6 %	0,0 %	+
<i>vat</i>	0,0 %	70,0 %	1,5 %	+++
<i>hlyA</i>	63,3 %	70,0 %	7,4 %	+++
Invasine				

Tabelle 9: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Hunden und Katzen (n = 70), Schweinen (n = 30) bzw. Rindern (n = 68) mit Gastroenteritis (GE)

Gen	Wirt / Erkrankung			Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / GE	Kleintier / GE	Rind / GE	
<i>gimB</i>	0,0 %	12,9 %	0,0 %	+++
<i>ibeA</i>	0,0 %	22,9 %	2,9 %	+++
<i>tia</i>	0,0 %	8,6 %	10,3 %	-
<i>Rpai (malX)</i>	10,0 %	80,0 %	2,9 %	+++
<i>pic</i>	0,0 %	47,1 %	1,5 %	+++

¹ = asymptotische zweiseitige Signifikanz nach Pearson (Chi-Quadrat-Test); Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den Spezies

Tabelle 10: Relative Häufigkeit der 11 getesteten InPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Hunden und Katzen (n = 70), Schweinen (n = 30) bzw. Rindern (n = 68) mit Gastroenteritis (GE)

Toxin / Fimbrie	Wirt / Erkrankungen			Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / GE	Kleintier / GE	Rind / GE	
<i>est-II</i>	46,7 %	0,0 %	1,5 %	+++
<i>est-la</i>	26,7 %	5,7 %	8,8 %	+++
<i>fanA</i>	0,0 %	0,0 %	8,8 %	++
<i>eltB-1</i>	50,0 %	0,0 %	0,0 %	+++
<i>fedA</i>	26,7 %	0,0 %	0,0 %	+++
<i>fasA</i>	3,3 %	0,0 %	0,0 %	!
<i>faeG</i>	46,7 %	0,0 %	0,0 %	+++
<i>fimF41</i>	0,0 %	0,0 %	5,9 %	+
<i>stx2e</i>	23,3 %	0,0 %	0,0 %	+++
<i>eaeA</i>	0,0 %	5,7 %	4,4 %	+++
<i>stx1</i>	0,0 %	0,0 %	0,0 %	

¹ = asymptotische zweiseitige Signifikanz nach Pearson (Chi-Quadrat-Test); Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den Spezies

4.2.5. Vergleich aller *E. coli*-Isolate aus dem Urogenitaltrakt

Insgesamt konnten für die meisten der 34 getesteten VAGe deutlich höhere Prävalenzen bei den Isolaten aus dem UGT des Kleintieres als bei den Isolaten aus dem UGT des Schweins festgestellt werden, dies war meist sehr bis höchst signifikant. Jedoch kam auch etwa ein Drittel von ihnen, allerdings mit geringeren Differenzen (bis auf fünf Ausnahmen nicht signifikant), häufiger bei den Isolaten vom Schwein vor (Tabelle 11). Besonders ausgeprägte, sehr signifikante Prävalenzunterschiede zeigten sich unter Anderem für die Gene *ireA* (Sw: 0 %; KT: 29 %), *sat* (Sw: 0 %; KT: 24,6 %) sowie *tia* (Sw: 0 %; KT: 21,7 %), gefolgt von *Rpai (malX)* (Sw: 4,4 %; KT: 100 %), *sfa/foc* (Sw: 4,3 %; KT: 75,4 %), *hlyA* (Sw: 8,7 %; KT: 68,1 %), *chuA* (Sw: 8,7 %; KT: 88,4 %) und *papC* (Sw: 4,3 %; KT: 66,7 %),

welche alle um ein Vielfaches häufiger bei den Isolaten vom Kleintier nachgewiesen wurden. Bei den elf VAGen, die häufiger bei den Isolaten vom Schwein als bei den Isolaten vom Kleintier vorkamen, waren die Unterschiede in der Prävalenz nur bei drei von Ihnen sehr bis höchst signifikant. Dies waren die Gene *iss* (Sw: 39,1 %; KT: 8,7 %), *sitD* (episomal) (Sw: 43,5 %; KT: 14,5 %) und *crlA* (Sw: 100 %; KT: 63,8 %).

Tabelle 11: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Kleintieren (n = 69) und Schweinen (n = 23) mit einer Urogenitaltraktinfektion (UGTI)

Gen	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Kleintier / UGTI	
Adhäsine			
<i>afa/draBC</i>	0,0 %	0,0 %	
<i>crlA</i>	100,0 %	63,8 %	+++
<i>hrlA/hek</i>	17,4 %	81,2 %	+++
<i>fimC</i>	91,3 %	100,0 %	!
<i>iha</i>	0,0 %	7,2 %	-
<i>papC</i>	4,3 %	66,7 %	+++
<i>sfa/foc</i>	4,3 %	75,4 %	+++
<i>tsh</i>	13,0 %	0,0 %	+
<i>mat</i>	73,9 %	97,1 %	++
Eisenaquisitionssysteme			
<i>fyuA</i>	30,4 %	69,6 %	+++
<i>chuA</i>	8,7 %	88,4 %	+++
<i>feoB</i>	100,0 %	94,2 %	-
<i>sitD</i> (epis)	43,5 %	14,5 %	++
<i>sitD</i> (chro)	4,3 %	50,7 %	+++
<i>ireA</i>	0,0 %	29,0 %	++
<i>iroN</i>	34,8 %	78,3 %	+++
<i>irp2</i>	30,4 %	88,4 %	+++
<i>iucD</i>	39,1 %	15,9 %	+
Serumresistenz			
<i>colV</i>	26,1 %	10,1 %	!
<i>iss</i>	39,1 %	8,7 %	++

Tabelle 11: Relative Häufigkeit der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Kleintieren (n = 69) und Schweinen (n = 23) mit einer Urogenitaltraktinfektion (UGTI)

Gen	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ¹ der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Kleintier / UGTI	
<i>neuC</i>	26,1 %	13,0 %	!
<i>kpsMTII</i>	26,1 %	52,2 %	+
<i>ompA</i>	100,0 %	94,2 %	-
<i>traT</i>	52,2 %	31,9 %	!
Toxine			
<i>cnf 1</i>	17,4 %	36,2 %	!
<i>astA</i>	8,7 %	0,0 %	!
<i>sat</i>	0,0 %	24,6 %	++
<i>vat</i>	4,3 %	59,4 %	+++
<i>hlyA</i>	8,7 %	68,1 %	+++
Invasine			
<i>gimB</i>	0,0 %	15,9 %	!
<i>ibeA</i>	4,3 %	29,0 %	+
<i>tia</i>	0,0 %	21,7 %	+
<i>Rpai (malX)</i>	4,3 %	85,5 %	+++
<i>pic</i>	8,7 %	34,8 %	+

¹ = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den Spezies

4.3. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Alle Isolate wurden mittels Multilocus Sequenztypisierung (MLST) untersucht. Die 260 Isolate konnten 83 verschiedenen Sequenztypen (STen) und 18 verschiedenen Sequenztyp-Komplexen (STCen) zugeordnet werden, wobei 107 der Isolate einem ST angehören, der bisher keinem Komplex zugeordnet wird. Von den 83 STen waren 52 bekannte STen mit Referenzstämmen auf der MLST-Datenbank der University College Cork. Zu diesen bekannten STen gehörten 83,5 % der Stämme. Es wurden 32 neue STen gefunden. Bis auf

wenige Ausnahmen kamen die neuen STen nicht mehrmals vor. Diese neuen STen erhielten nach Übertragung auf die MLST-Datenbank in der Reihenfolge ihrer Identifizierung entsprechende Nummern.

4.3.1 Sequenztypen der *E. coli*-Isolate vom Kleintier

Tabelle 12: Relative Häufigkeit der Sequenztypen¹ bei 139 Isolaten von Hunden und Katzen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 69) bzw. Gastroenteritis (GE) (n = 70)

Sequenztyp	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ² der Unterschiede
	Kleintier / UGTI	Kleintier / GE	
ST10	4,3 %	2,9 %	-
ST12	18,8 %	7,1 %	+
ST73	18,8 %	22,9 %	-
ST80	1,4 %	5,7 %	-
ST127	7,2 %	2,9 %	-
ST141	8,7 %	8,6 %	-
ST372	8,7 %	2,9 %	-
Andere	32,1 %	47,0 %	

1 = dargestellt nur Sequenztypen, die mindestens fünfmal nachgewiesen werden konnten

2 = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den beiden Habitaten

Der häufigste ST, der bei den 139 Isolaten vom Kleintier nachgewiesen wurde, war ST73, dem 29 (20,1 %) der Isolate zugeordnet werden konnten (Tabelle 12). 13 dieser Isolate stammten von Kleintieren mit UGT-Infektion und 16 von Kleintieren mit GE. Dem ST73 gehörten 32 (23 %) der Isolate an. Zweithäufigster ST war ST12 mit 18 Isolaten (12,9 %) (UGTI: n=13; GE: n=5), gefolgt von ST141 mit zwölf Isolaten (8,6 %) (UGTI: n=6; GE: n=6), ST372 mit acht Isolaten (5,8 %) (UGTI: n=6; GE: n=2) und ST127 mit sieben Isolaten (5 %) (UGTI: n=5; GE: n=2). Die übrigen 44 STen, die beim Kleintier gefunden wurden, sind jeweils mit weniger als 4 % vertreten und kommen häufig nur einmal vor.

4.3.1.1. Vergleich der STen der *E. coli*-Isolate aus dem GIT und dem UGT von Hund und Katze

Wie in Tabelle 12 dargestellt ist keiner der mit mindestens 5 % vertretenen STen für eines der beiden Habitate Urogenitaltrakt oder Gastrointestinaltrakt exklusiv. Mit Ausnahme des ST12, der mit 18,8 % gegenüber 7,1 % signifikant häufiger im UGT als im GIT nachgewiesen wurde, waren die Unterschiede der Prävalenzen der einzelnen STen zwischen den beiden Habitaten nicht signifikant. Obwohl dies im Falle des ST10 und des ST80 auch auf die eingeschränkte Validität des exakten Signifikanz-Testes nach Fisher, auf Grund der geringen Zahl positiver Isolate, zurückzuführen ist, wird deutlich, dass in beiden Habitaten die gleichen STen dominieren. Besonders der mit Abstand häufigste Sequenztyp 73 bei den Isolaten vom Kleintier, kam mit 18,8 (UGTI) bzw. 22,9 % (GE) in beiden Habitaten fast gleich oft vor.

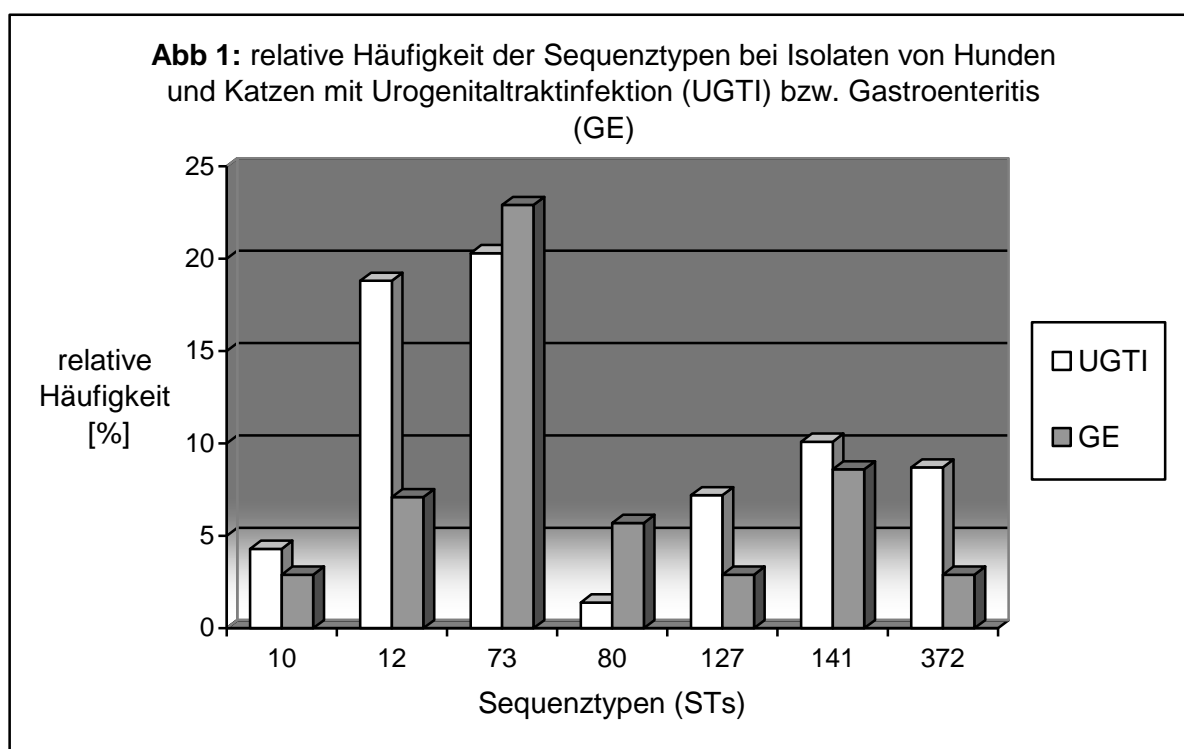


Abb 1: Relative Häufigkeit der STen bei den 139 Isolaten von Hunden und Katzen mit UGTI (weiß; n = 69) bzw. GE (grau; n = 70); dargestellt nur STen, die mindestens fünfmal nachgewiesen werden konnten

4.3.2. Sequenztypen der *E. coli*-Isolate vom Schwein

Bei den 53 Isolaten vom Schwein unterschied sich die Verteilung der STen stark von der bei den Isolaten vom Kleintier. Der am häufigsten gefundene ST bei den Isolaten vom Schwein war der ST100 mit 30,2 % (UGTI: 0 %; GE: 53,3 %), gefolgt von ST10 mit 11,3 % (UGTI: 8,7

%; GE: 13,3 %) und ST1 mit 7,5 % (UGTI: 0 %; GE: 13,3 %) (Tabelle 13). Somit gehörten 49,1 % aller Isolate vom Schwein einem dieser drei STen an. Alle übrigen STen konnten maximal zweimal nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Relative Häufigkeit der Sequenztypen¹ bei 53 Isolaten von Schweinen mit Urogenitaltrakt (UGTI) (n = 23) bzw. Gastroenteritis (GE) (n = 30)

Sequenztyp	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ² der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Schwein / GE	
ST1	0,0 %	13,3 %	!
ST10	8,7 %	13,3 %	-
ST23	4,3 %	0,0 %	-
ST42	0,0 %	6,7 %	
ST58	8,7 %	0,0 %	
ST100	0,0 %	53,3 %	+++
ST101	8,7 %	0,0 %	
ST398	13,0 %	0,0 %	
ST641	8,7 %	0,0 %	!
Andere	47,9 %	13,4 %	

¹ = dargestellt nur Sequenztypen, die mindestens zweimal nachgewiesen werden konnten

² = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den beiden Habitaten

4.3.2.1. Vergleich der STen der *E. coli*-Isolate aus dem GIT und dem UGT des Schweins

Wie in Tabelle 13 zu erkennen gab es bei den Isolaten vom Schwein, mit Ausnahme des ST10, bei den mehr als einmal vorkommenden STen keine Überschneidungen zwischen den Isolaten aus dem UGT und denen aus dem GIT. Auch wenn sich die Signifikanz nach Fisher bis auf eine Ausnahme nicht oder nur mit eingeschränkter Validität errechnen ließ, wurden die starken Unterschiede zwischen diesen beiden Habitaten durch diese Exklusivität doch deutlich. Auffällig war, dass bei den Isolaten aus dem UGT die STen sehr variabel waren, hier kam kein ST häufiger als dreimal vor und die meisten nur einmal. Hingegen gehörten 80

% der Isolate aus dem GIT zu nur drei verschiedenen STen (ST100 (53,3 %), ST10 (13,3 %) und ST1 (13,3 %)). Diese STen gehören jedoch unterschiedlichen ST-Komplexen an, bzw. im Falle von ST1 keinem ST-Komplex.

4.3.3. Sequenztypen der *E. coli*-Isolate vom Rind

Die Verteilung der STen bei den 68 Isolaten vom Rind unterschied sich ebenfalls stark von der bei den Isolaten der anderen Spezies. 63,3 % der Isolate konnten nur sechs verschiedenen STen zugeordnet werden (Tabelle 14). 50 % der Isolate gehörten nur zwei verschiedenen ST-Komplexen an. Dies waren mit 36,8 % der STC10 sowie der STC23 mit 12,2 %. Die am häufigsten nachgewiesenen STen waren ST10 (22,1 %), ST167 (14,7 %) sowie ST88 (8,8 %), gefolgt von ST783 (7,4 %), ST301 (5,9 %) und ST23 (4,4 %). Da sowohl ST10 als auch ST167 zum ST-Komplex 10 gehören, war mit 36,8 % eine große Mehrheit der 80 Isolate vom Rind diesem ST-Komplex zuzuordnen. ST23 und ST88 gehören beide zum ST-Komplex 23.

Tabelle 14: Relative Häufigkeit der Sequenztypen¹ bei Isolaten von Rindern mit Gastroenteritis (GE) (n = 68)

Sequenztyp	Wirt / Erkrankung
	Rind / GE
ST10	22,1 %
ST23	4,4 %
ST88	8,8 %
ST167	14,7 %
ST301	5,9 %
ST783	7,4 %
Andere	36,7 %

¹ = dargestellt nur Sequenztypen, die mindestens zweimal nachgewiesen werden konnten

4.3.4. Vergleich aller *E. coli*-Isolate aus dem Gastrointestinaltrakt

Tabelle 15: Relative Häufigkeit der Sequenztypen¹ bei Isolaten von Hunden und Katzen (n = 70), Schweinen (n = 30) bzw. Rindern (n = 68) mit Gastroenteritis (GE)

Sequenztyp	Wirt / Erkrankung			Signifikanz ² der Unterschiede
	Schwein / GE	Kleintier / GE	Rind / GE	
ST1	13,3 %	0,0 %	0,0 %	+++
ST10	13,3 %	2,9 %	22,1 %	++
ST12	0,0 %	7,1 %	0,0 %	+
ST23	0,0 %	0,0 %	4,4 %	!
ST42	6,7 %	0,0 %	0,0 %	
ST73	0,0 %	22,9 %	0,0 %	+++
ST80	0,0 %	5,7 %	0,0 %	!
ST88	0,0 %	1,4 %	8,8 %	+
ST100	53,3 %	0,0 %	0,0 %	+++
ST127	0,0 %	2,9 %	0,0 %	-
ST141	0,0 %	8,6 %	0,0 %	++
ST167	0,0 %	0,0 %	14,7 %	+++
ST301	0,0 %	0,0 %	5,9 %	+
ST372	0,0 %	2,9 %	0,0 %	-
ST641	0,0 %	4,3 %	0,0 %	!
ST783	0,0 %	0,0 %	7,4 %	+
Andere	13,4 %	41,3 %	36,7 %	

¹ = dargestellt nur Sequenztypen, die mindestens zweimal nachgewiesen werden konnten

² = asymptotische zweiseitige Signifikanz nach Pearson (Chi-Quadrat-Test); Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den Spezies

Mit Ausnahme des ST10, der bei allen Spezies im GIT zu finden war (KT: 2,9 %; Sw: 13,3 %; Rd: 22,1 %), kamen die bei den verschiedenen Spezies häufig vorkommenden STen bei den jeweils anderen Spezies sehr selten bzw. gar nicht vor (Tabelle 15). Auf Grund dieser Exklusivität werden die Unterschiede der ST-Muster zwischen den verschiedenen Spezies

sehr deutlich. In den wenigen Fällen, in denen hierfür keine Signifikanz errechnet wurde, lag dies an einer zu geringen Zahl zugehöriger Stämme, und damit einer herabgesetzten Validität des exakten Signifikanz-Testes nach Fisher. Hervorzuheben sind besonders die Sequenztypen ST73, ST100 und ST167, die jeweils bei einer der Spezies besonders häufig vorkamen, ohne bei einer der anderen beiden Tierarten nachgewiesen werden zu können.

Tabelle 16: Relative Häufigkeit der Sequenztypen¹ bei Isolaten von Kleintieren (n = 69) und Schweinen (n = 23) mit einer Urogenitaltraktinfektion (UGTI)

Sequenztyp	Wirt / Erkrankung		Signifikanz ² der Unterschiede
	Schwein / UGTI	Kleintier / UGTI	
ST10	8,7 %	4,3 %	-
ST12	0,0 %	18,8 %	+
ST23	4,3 %	0,0 %	-
ST58	8,7 %	0,0 %	
ST73	0,0 %	18,8 %	+
ST80	0,0 %	1,4 %	-
ST88	0,0 %	2,9 %	-
ST101	8,7 %	0,0 %	
ST127	0,0 %	7,2 %	-
ST141	0,0 %	8,7 %	-
ST372	0,0 %	8,7 %	-
ST398	13,0 %	0,0 %	
ST641	8,7 %	0,0 %	!
Andere	47,9 %	29,2 %	

¹ = dargestellt nur Sequenztypen, die mindestens zweimal nachgewiesen werden konnten

² = exakte Signifikanz nach Fisher; Signifikanz der Prävalenzunterschiede zwischen den Spezies

4.3.5. Vergleich aller *E. coli*-Isolate aus dem Urogenitaltrakt

Auch bei den Isolaten aus dem UGT kamen, mit Ausnahme des ST10 (Sw: 8,7 %; KT: 4,3 %), die mindestens zweimal nachgewiesenen STen nur bei jeweils einer der Spezies vor (Tabelle 16). Auch hier sind auf Grund dieser Exklusivität der einzelnen STen für eine der

beiden Tierarten deutliche Unterschiede in den Prävalenzen zu erkennen, auch wenn diese aus den oben beschriebenen mathematischen Gründen meist nicht als signifikant errechnet werden konnten. Hervorzuheben sind bei Betrachtung der Isolate dieses Habitats, und beim Vergleich der Isolate von Hund und Katze mit denen vom Schwein, die Sequenztypen ST398 bzw. ST12 und ST73, die beim Schwein bzw. beim Kleintier relativ häufig vorkamen, ohne bei der jeweils anderen Spezies nachgewiesen werden zu können.

4.4. Zusammenhang zwischen O-Serotypen und Virulenz-assoziierten Genen der *E. coli*-Isolate vom Kleintier

Tabelle 17: Anzahl ExPEC-assoziiierter Gene pro Isolat innerhalb der verschiedenen O-Serotypen bei 139 Isolaten von Hunden und Katzen (UGTI: n = 69; GE: n = 70), dargestellt nur O-Serotypen, die mindestens sechsmal nachgewiesen werden konnten

O-Typ	Anzahl ExPEC-assoziiierter VAGe pro Isolat				Anzahl der Stämme
	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	
O2	18,8	14	24	18	13
O6	17,6	6	21	18	25
O18	16,8	12	20	17	14
O21	14,8	10	20	14,5	6
O22	16,9	12	19	17	7
O25	17,3	14	23	16	7
O74	18,3	16	22	18	9
Orauh	12	9	19	11	10
Alle	15,8	6	24	17	139

Die durchschnittliche Anzahl an VAGen unterschied sich innerhalb der verschiedenen, mindestens viermal nachgewiesenen O-Serotypen nur wenig. Mit einer durchschnittlichen Anzahl von 18,8 VAGen pro Isolat wies der O-Serotyp O2 die meisten und mit 14,8 der O-Serotyp O21 die wenigsten VAGe auf. Das Isolat mit der größten Anzahl an Virulenzfaktoren (24) konnte dem Serotyp O2 zugeordnet werden. Bei den übrigen O-Serotypen liegt die Anzahl der VAGe zwischen 16,8 und 18,3. Auffällig ist jedoch, dass die Isolate, die den in

Tabelle 17 aufgeführten O-Serotypen zugeordnet werden konnten, mit durchschnittlich 17,5 VAGen mehr Virulenzfaktoren aufwiesen als der Gesamtdurchschnitt mit 15,8.

4.5. Zusammenhang zwischen O-Serotypen und Sequenztypen

4.5.1. Zusammenhang zwischen O-Serotypen und STen der *E. coli*-Isolate vom Kleintier

Tabelle 18: Anzahl der „Sequenz O Typen“ unter den 139 Isolaten von Hunden und Katzen (UGTI: n = 69; GE: n = 70), d.h. der Isolate, denen Kombinationen einer der häufiger nachgewiesenen O-Serotypen mit einer der häufiger nachgewiesenen Sequenztypen zugeordnet werden konnten.

STen	O-Serotypen								
	O2	O4	O6	O18	O21	O22	O25	O74	O145
12	0	3	0	11	0	0	0	1	0
73	0	0	11	0	0	3	6	3	0
80	3	0	0	0	0	0	0	0	0
127	0	0	6	0	0	0	0	0	0
141	6	0	0	0	0	0	0	5	0
372	0	1	0	0	2	0	1	0	2
625	0	0	2	0	0	0	0	0	0
646	0	0	0	0	0	3	0	0	0
929	0	0	0	0	3	0	0	0	0
968	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Es konnten deutliche Zusammenhänge zwischen dem Sequenztyp der Stämme und dem O-Serotyp, dem diese zugeordnet werden konnten, festgestellt werden. So gehörten z.B. elf der vierzehn Isolate dem Serotyp O18 zum ST12 und umgekehrt elf der achtzehn Isolate des ST12 zum Serotyp O18 (Tabelle 18). Die Isolate des Serotyp O6 gehörten hingegen überwiegend zu ST73 (n = 11) und ST127 (n = 6). Umgekehrt konnten jedoch auch viele der Isolate des ST73 dem Serotyp O25 (n = 6) zugeordnet werden.

Die häufigsten Kombinationen, beschrieben als „Sequenz-O-Typen“ (Bidet, Mahjoub-Messai et al. 2007), sind ST12-O18 (n = 11), ST73-O6 (n = 11), ST73-O25 (n = 6), ST127-O6 (n = 6), ST141-O2 (n = 6) und ST141-O74 (n = 5).

4.6. Zusammenhang zwischen Virulenz-assoziierten Genen und Sequenztypen

4.6.1. Zusammenhang zwischen VAGen und STen der *E. coli*-Isolate vom Kleintier

Bei einer gesamtdurchschnittlichen Anzahl von 15,8 VAGen pro Stamm unter den Isolaten von Hund und Katze und 12,7 unter allen Isolaten, (GE: 15,5; UGTI: 16,1) wiesen die Isolate mit dem ST80 mit im Durchschnitt 19 VAGen pro Isolat, gefolgt von ST73 (18,5) und ST141 (18,3), eine höhere Anzahl an VAGen auf (Tabelle 16). Der Stamm mit der höchsten Anzahl an VAGen (24) wurde als ST141 typisiert. Im Gegensatz hierzu trugen die Isolate vom Kleintier, die dem ST10 zugeordnet wurden, im Durchschnitt nur 8,6 der getesteten Virulenz-assoziierten Gene (ST10 gesamt: 8,4). Einer der zwei Stämme mit der geringsten Anzahl (6) an VAGen gehörte zu ST10. 52,9 % der Isolate mit mindestens 20 VAGen gehörten zu ST73. Von den Isolaten mit weniger als 10 VAGen gehörten 25 % zu ST10 und 18,8% zu ST641 (Durchschnitt: 7,6), alle übrigen bei diesen Stämmen nachgewiesenen STen kamen nur einmal vor.

Bei Betrachtung der Virulenz-assoziierten Gene mit geringer Prävalenz fiel auf, dass von 23 *sat1*-positiven Stämmen 7 (30,4 %) dem STC73 und 3 (13 %) dem STC12, von 21 *tia*-positiven 5 (23,8 %) dem STC73 und 5 (23,8 %) dem STC12, von den 39 *ireA*-positiven 13 (33,3 %) dem STC73 und 7 (17,9 %) dem STC12 sowie von 10 *iha*-positiven ebenfalls 6 (50 %) dem STC73 angehörten.

Für andere STen konnte keine deutlich höhere Prävalenz eines bestimmten Virulenz-assoziierten Gens nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Anzahl ExPEC-assoziiertes Gene pro Isolat innerhalb der verschiedenen Sequenztypen bei 260 Isolaten von Hunden und Katzen (n = 139), Schweinen (n = 53) und Rindern (n = 68), dargestellt nur STen, die mindestens viermal nachgewiesen werden konnten

STen	Anzahl ExPEC-assoziiertes VAGe pro Isolat				
	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	N
ST1	7,3	5	9	7,5	4
ST10	8,4	5	12	8	26
ST12	16,8	12	21	17	18
ST23	12,5	10	16	12	4
ST73	18,5	14	23	18	29
ST80	19	17	23	18	5
ST88	13,4	10	17	14	9
ST100	6,3	5	9	6	16
ST127	17,4	15	19	18	7
ST141	18,3	16	24	18	12
ST167	8,7	6	13	8	10
ST301	9,3	9	10	9	4
ST372	15,1	12	17	15,5	8
ST641	7,6	4	9	8	5
ST783	12	8	13	13	5
Alle STen	12,7	3	24	12	260
Wirt					
Kleintier	15,8	6	24	17	139
Schwein	8,1	3	21	8	53
Rind	12,1	6	19	12	68

4.6.2. Zusammenhang zwischen VAGen und STen der *E. coli*-Isolate vom Schwein

Bei den Isolaten vom Schwein konnte lediglich eine durchschnittliche Anzahl von 8,1 (UGTI: 9,2; GE: 7,2) VAGen pro Stamm gefunden werden (Tabelle 16). Deutlich über diesem Wert lagen bei diesen Isolaten der ST23 mit einer durchschnittlichen Anzahl von 12,5 VAGen pro Stamm. Der Sequenztyp 100 wies mit einem Wert von 6,3 deutlich weniger Virulenz-assoziierte Gene auf. 52,6 % der Isolate mit höchstens sechs VAGen gehörten diesem Sequenztyp an. ST1 und ST641 lagen mit einer durchschnittlichen Anzahl von 7,3 bzw 7,6 VAGen pro Stamm nahe dem Durchschnitt. Das Isolat vom Schwein mit der größten Anzahl an VAGen (21) gehörte dem, bei diesen nur einmal nachgewiesenen, ST625 an.

4.6.3. Zusammenhang zwischen VAGen und STen der *E. coli*-Isolate vom Rind

Die Isolate vom Rind trugen im Schnitt 12,1 Virulenz-assoziierte Gene pro Stamm (Tabelle 16). Bei den Isolaten der Sequenztypen ST167 und ST301 konnten die geringsten Anzahlen (8,7 bzw. 9,3) an VAGen nachgewiesen werden. Wie bei den Isolaten vom Kleintier wiesen bei den Isolaten vom Rind ebenfalls die als ST10 typisierten Isolate durchschnittlich relativ wenige (10,4) Virulenz-assoziierte Gene auf. 63,3 % der Isolate mit höchstens neun VAGen gehörten dem ST-Komplex STC10 an. Die meisten Virulenz-assoziierten Gene (15,3) konnten auch beim Rind bei den Isolaten des ST-Komplexes STC23 nachgewiesen werden (ST88 und ST23 je 15,3). 83,3 % der Isolate mit mindestens 16 VAGen sowie der Stamm mit den meisten VAGen (19) gehörten diesem Komplex an.

5. Diskussion

5.1. Habitatspezifität der Isolate vom Menschen

Um die für die Isolate dieser Arbeit ermittelten Sequenztypen mit entsprechenden Daten zu humanen Isolaten vergleichen zu können, wurden die zu diesem Zeitpunkt auf der MLST-Datenbank der University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) befindlichen Stämme herangezogen. Diese Isolate wurden im Zusammenhang mit verschiedensten Studien, und vermutlich nach sehr unterschiedlichen Kriterien, auf der ganzen Welt gewonnen. Entsprechend kritisch ist die statistische Auswertung zu betrachten. Auf Grund der großen Anzahl von Stämmen, kann man jedoch davon ausgehen, dass die Ergebnisse der tatsächlichen Situation zumindest nahe kommen, und diese, besonders in Ermangelung anderer Daten, zum Vergleich verwendet werden können.

Zum Zeitpunkt der Auswertung befanden sich 1283 humane Isolate auf der MLST-Datenbank. 339 dieser Stämme wurden von Menschen mit einer Gastroenteritis und 281 von Menschen mit einer Urogenitaltraktinfektion isoliert. Von 150 der GE-Isolate sowie 69 der UGTI-Isolate war zusätzlich auch der O-Serotyp bekannt.

Bei den *E. coli*-Isolaten von Menschen mit einer UGTI dominierten die O-Serotypen O6 und O25 (jeweils 14,5 %), gefolgt von O2 (11,6 %) sowie O1 (8,7 %). Bei den *E. coli*-Isolaten von Menschen mit einer GE waren dies die Serotypen O111 (9,3 %), O124 (8 %) sowie O55 (6 %).

Die mindestens sechsmal nachgewiesenen O-Serotypen bei den Isolaten vom Menschen waren bis auf wenige Ausnahmen exklusiv für jeweils nur eine der beiden Erkrankungen (Abb. 2).

Bei der Verteilung der Sequenztypen zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb.3). Mit Ausnahme von ST10 waren alle der mindestens sechsmal vorkommenden STen für eins der beiden Habitate exklusiv.

Bei den Isolaten aus dem UGT wurden 101 und bei denen aus dem GIT 219 verschiedene STen nachgewiesen. Die meisten dieser STen kamen nur vereinzelt vor. Gerade 13,7 % der GE-Isolate konnten den fünf häufigsten STen zugeordnet werden, bei den UGTI-Isolaten waren dies 36,3 %. Insgesamt schienen die STen sehr variabel zu sein.

Die dominierenden STen bei *E. coli*-Isolaten von UGT-Infektionen des Menschen waren ST69 (9,3 %) und ST95 (8,9 %), gefolgt von ST73 (6,4 %), ST141 (6 %), ST131 (5,7 %) sowie ST10 (5 %). Bei Gastroenteritiden waren es ST10 (4,1 %) und ST6 (3 %), gefolgt von ST243 (2,4 %), ST245 (2,1 %) sowie ST394 (2,1 %).

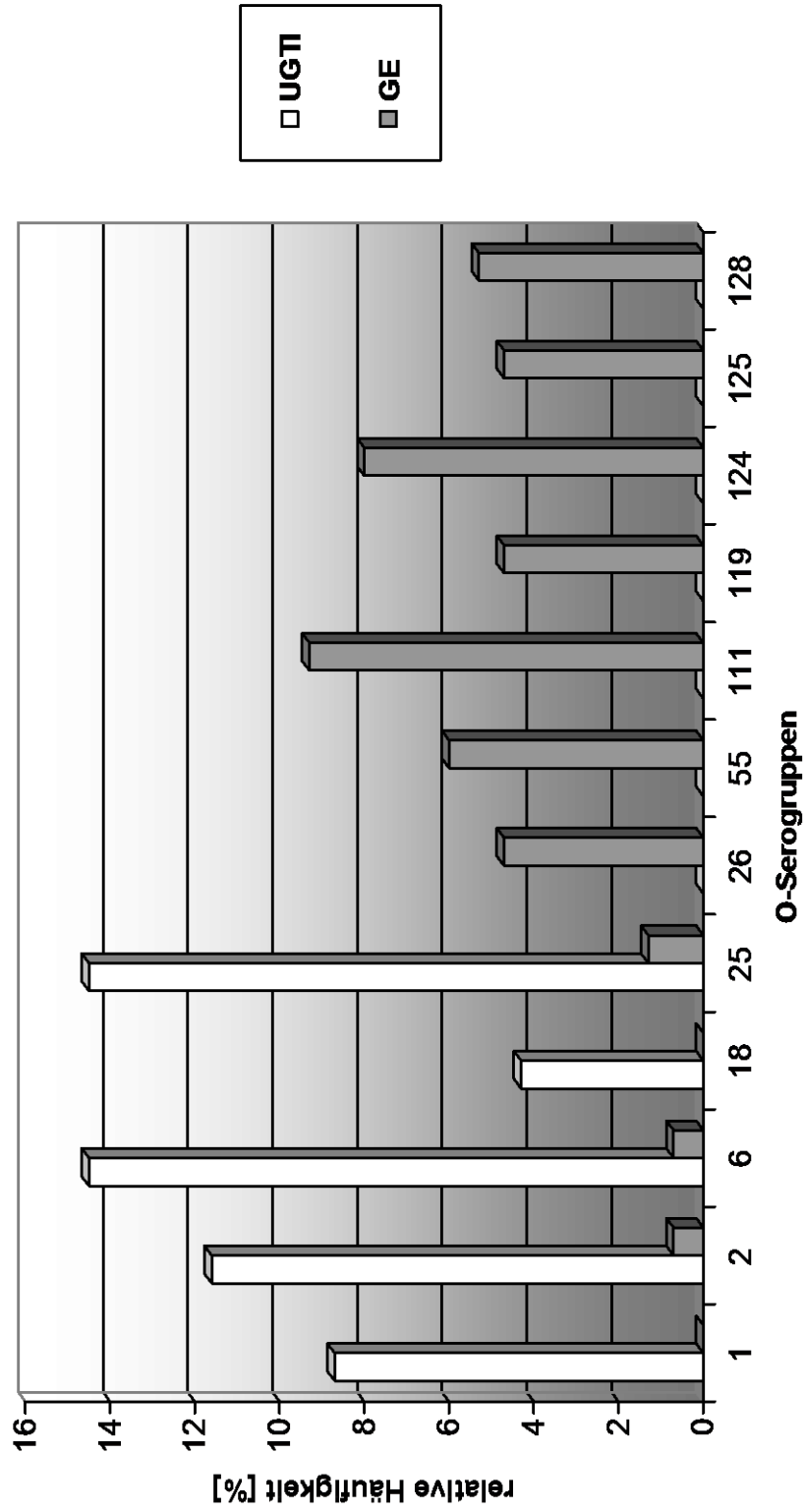
Beim Vergleich der Isolate von Menschen mit UGTI mit den Isolaten von Menschen mit GE fällt auf, dass die durchfallerregenden *E. coli* in ihren STen und O-Serotypen wesentlich variabler sind als die UPEC-Stämme. Dies könnte daran liegen, dass für die Virulenz darmpathogener *E. coli*-Stämme (InPEC) weniger VAGe entscheidend sind, sowie daran, dass jeder Stamm die entsprechenden Gene leicht durch horizontalen Transfer erhalten und exprimieren kann und damit Pathogenität erlangt. Dies bestätigen epidemiologische Studien, die für InPEC keinen evolutionären Ursprung erkennen konnten, sondern zu dem Schluss kamen, dass diese mehrfach unabhängig voneinander durch Aquirierung der entsprechenden Gene entstanden sind, was auch dadurch erleichtert wird, dass sich diese Gene auf Plasmiden, in einem Phagengenom oder innerhalb von Pathogenitätsinseln befinden (Pupo, Karaolis et al. 1997; Peixoto, Bando et al. 2001; Turner, Chaudhuri et al. 2006).

Es wird allgemein angenommen, dass sich Menschen bei einer UGTI über ihren Stuhl infizieren, jedoch sind einige Autoren der Meinung dieser sei kein permanentes Reservoir für humane UPEC, da sich rektale Isolate meist stark von UPEC unterscheiden (Carbonetti, Boonchai et al. 1986; Johanson, Plos et al. 1993; Guyer, Kao et al. 1998; Vagarali, Karadesai et al. 2008). Dies bestätigen auch die Daten der MLST-Datenbank über humane Isolate. Jedoch zum Zeitpunkt einer UGTI lässt sich der entsprechende UPEC-Stamm fast immer auch im Darm des Patienten finden. So auch in einer Studie von Moreno et al., in der von 42 Frauen mit UGTI sowohl Urin- als auch Stuhl-Proben untersucht wurden, und bis auf vier konnten alle Urin-Isolate auch im Stuhl der entsprechenden Frau gefunden werden (Moreno, Andreu et al. 2008). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die für ein UPEC-Reservoir im menschlichen Darm sprechen, in denen entsprechende VAGe in rektalen Isolaten vermehrt nachgewiesen wurden (Siitonen 1992; Wold, Caugant et al. 1992; Kuhar, Grabnar et al. 1998). Zelladhäsionsversuche mit humanen Darmzellen ergaben, dass Fimbrien, die die Kolonisierung des UGT vermitteln sollen, möglicherweise auch zur Bindung an Enterozyten beitragen, eine Etablierung von UPEC-Stämmen im Darm ermöglichen und somit extraintestinale Infektionen erleichtern (Adlerberth, Hanson et al. 1995).

In einer Untersuchung, in der Isolate von Frauen mit UGTI mit Isolaten aus dem Stuhl gesunder Frauen verglichen wurden zeigte sich bei beiden eine ähnliche Verteilung der phylogenetischen ECOR-Gruppen, dennoch konnten keine Klone unter den urogenitalen und rektalen Isolaten ermittelt werden (Zhang, Foxman et al. 2002).

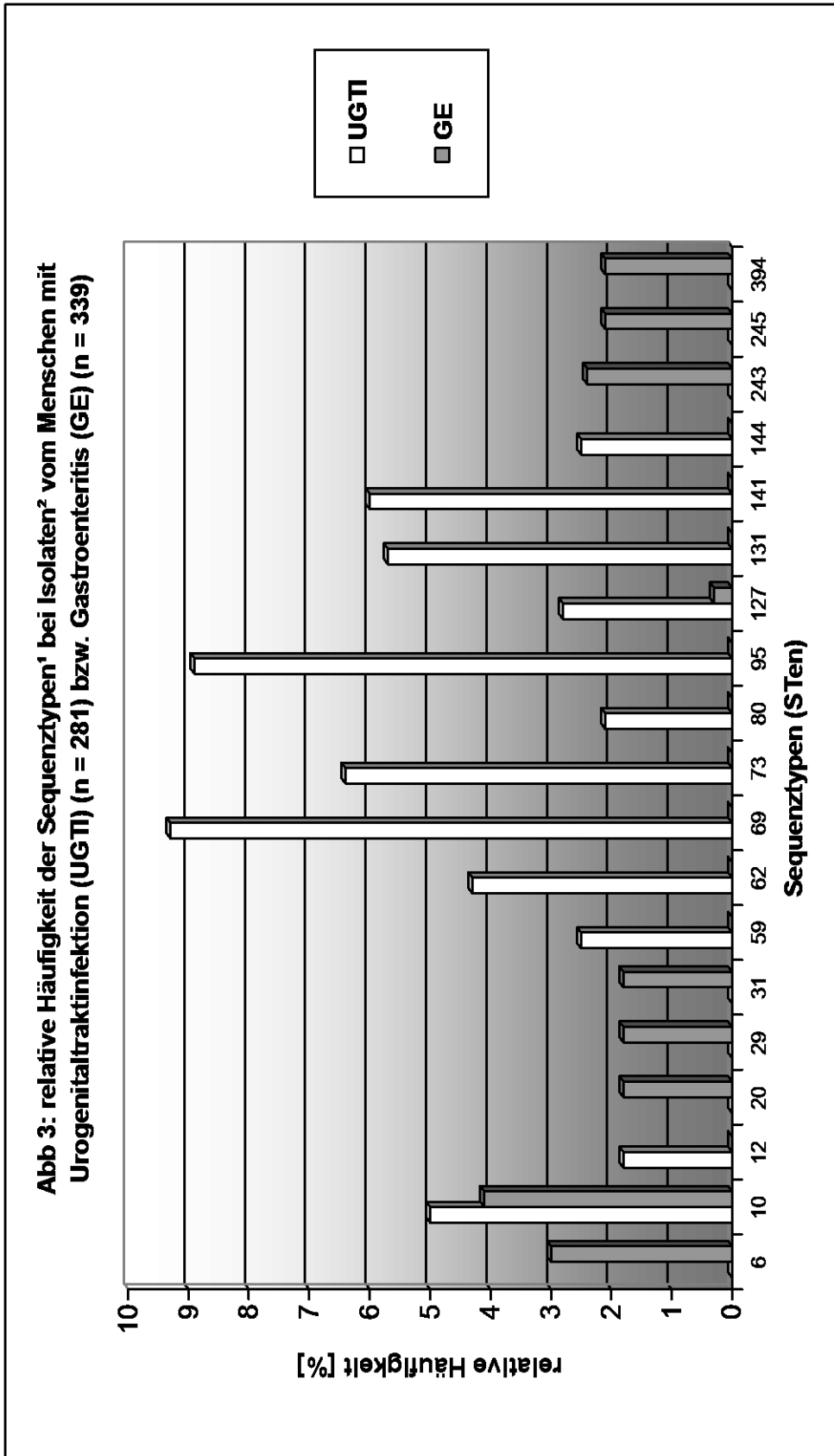
Es ist insgesamt anzunehmen, dass der Darm des Menschen zumindest temporär von humanen UPEC besiedelt wird.

Abb 2: relative Häufigkeit der O-Serogruppen¹ bei Isolat² von Menschen mit Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (n = 69) bzw. Gastroenteritis (GE) (n = 150)



1 = dargestellt nur O-Serotypen, die mindestens sechsmal vorkamen

2 = MLST-Datenbank der University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) (n = 219)



1 = dargestellt nur Sequenztypen, die mindestens sechsmal vorkamen
 2 = MLST-Datenbank der University College Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) (n = 632)

5.2. Habitatspezifität und Zoonosepotential der Isolate vom Kleintier

Welche Rolle die klassischen Pathotypen von *E. coli* als Erreger von Gastroenteritiden bei Hund und Katze spielen ist nicht bekannt. Dagegen ist *E. coli* sicher einer der häufigsten Verursacher von Infektionen des Urogenitaltraktes dieser Tiere. Dabei sind bakterielle Infektionen der Harnwege bei Hunden im Allgemeinen häufiger anzutreffen als bei Katzen, da diese über eine höhere Konzentrationsfähigkeit des Urins verfügen. Meist sind die unteren Harnwege betroffen, jedoch ist ein Aufsteigen der Bakterien in die Harnleiter und die Nieren eine häufige Folge solcher Infektionen (Lees and Rogers 1986; Wilson, Keefe et al. 1988; Norris, Williams et al. 2000; Oluoch, Kim et al. 2001). Außerdem ist *E. coli* der am häufigsten bei Hündinnen und Kätzinnen mit Pyometra isolierte Mikroorganismus. Hierbei wiesen Uteri, die mit *cnf1*-positiven *E. coli*-Stämmen infiziert waren, die schwersten histologischen Läsionen auf (Dhaliwal, Wray et al. 1998).

Entsprechend der klinischen Relevanz konzentriert sich die Mehrheit der Studien zu *E. coli* bei Hunden und Katzen auf deren Uropathogenität. Über Durchfall-auslösende *E. coli* bei diesen Tierarten konnte in der Literatur nur sehr wenig gefunden werden. Auf Grund dieser Tatsache ist der Vergleich zwischen den UGTI-Isolaten und den GE-Isolaten von Hund und Katze in dieser Studie besonders interessant.

Obwohl Stämme des Serotyps O2 bei den Haustieren ausschließlich aus dem UGT und des Serotyps O74 ausschließlich aus dem GIT isoliert werden konnten, sowie der Serotyp O18 signifikant häufiger im UGT der Tiere vorkam, wurde besonders im Vergleich mit den humanen Isolaten ein geringer Unterschied in der Verteilung der Serotypen innerhalb dieser beiden Habitate deutlich (Tabelle 1 und Abb. 2). Hervorzuheben sind die besonders häufig mit humanen UPEC assoziierten Serotypen O2, O6 und O25 (Abe, Salvador et al. 2008; Lau, Reddy et al. 2008), die bei den Tieren sogar häufiger im GIT als im UGT nachgewiesen wurden. Unter den O-Serotypen, die häufig bei UGTI des Menschen nachgewiesen wurden, kam nur O1 nicht bei den Isolaten vom Kleintier vor. Bei den Tieren trifft dies für die Serotypen O18 und O74 zu, die bei den humanen Isolaten bei keiner der beiden Erkrankungen gefunden wurden, beim Tier im UGT jedoch sehr häufig. Von den mindestens sechsmal bei den GIT-Isolaten des Menschen nachgewiesenen O-Serotypen konnte bis auf ein Isolat mit dem Serotyp O26 keiner bei den 139 *E. coli*-Isolaten von Hunden und Katzen gefunden werden.

Die Produkte der virulenzassoziierten Gene (VAGe), auf die die 139 *E. coli*-Isolate von Haustieren getestet wurden, haben unterschiedliche Funktionen, die letztendlich die

Kolonisierung und Invasion des Wirtes fördern, eine Vermeidung oder Störung dessen Immunsystems ermöglichen oder zu einer Verletzung und / oder einer Entzündung des Gewebes des Wirtes führen können.

Die Virulenz eines Stammes ist meistens verbunden mit dem Vorhandensein verschiedener VAGe (Picard, Garcia et al. 1999; Yuri, Nakata et al. 2000). Diese wiederum wurden in der Vergangenheit mit bestimmten Klonen oder phylogenetischen Gruppen assoziiert (Picard, Garcia et al. 1999; Johnson, Kaster et al. 2003). Nach der Meinung einiger Autoren sagt der PCR-Nachweis verschiedener VAGe wesentlich mehr über die Pathogenität eines Stammes aus als dessen O-Serotyp (Yuri, Nakata et al. 2000). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die vermuten lassen, dass nach dem bloßen Nachweis eines DNA-Abschnittes von einem dieser Gene mittels PCR noch keine Aussage über die Virulenz des Stammes getroffen werden kann, da die virulenzassoziierten Gene in einigen Stämmen nicht exprimiert werden (Zdziarski, Svanborg et al. 2008).

Von den meist als entscheidend für die Pathogenität von UPEC beschriebenen VAGe, der P-Fimbrie (*pap*), der S-Fimbrie (*sfa*), dem afimbriellen Adhäsion (*afa*), dem Hämolyysin A (*hlyA*), dem Zytotoxischen Nekrosefaktor 1 (*cnf1*) sowie dem Eisenakquisitionssystem Aerobactin (*iucD*) (Feria, Machado et al. 2001), konnte in dieser Untersuchung nur für *cnf1* ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Habitaten festgestellt werden. Viele Studien bestätigen, dass dieses VAG die Uropathogenität eines Stammes erheblich steigert (Yuri, Nakata et al. 2000; Rippere-Lampe, O'Brien et al. 2001). Obwohl bei den Isolaten von Hund und Katze dieses Gen signifikant mit den UGT-Isolaten assoziiert ist, ist jedoch auf Grund seiner geringen Prävalenz (36,2 %) unter den UPEC-Stämmen anzunehmen, dass er für eine UGTI nicht essentiell ist. Zudem konnte dieser Virulenzfaktor bei einer Untersuchung an GE-Isolaten von Hunden bei 17 von 24 Stämmen nachgewiesen werden (Prada, Baljer et al. 1991).

Eine Erklärung für das vermehrte Auftreten von „uropathogenen“ VAGen bei Kot-Isolaten wäre auch die Möglichkeit, dass bei diesen die Expression dieser Gene unterbleibt, da deren Expression einen besonderen genetischen Background benötigt (Picard, Garcia et al. 1999; Escobar-Paramo, Clermont et al. 2004), der bei den Genomen kommensaler bzw. durchfallerreger *E. coli* nicht gegeben ist (Welch, Burland et al. 2002). Sie führen daher zu keiner entsprechenden Virulenz.

Von den besonders häufig nachgewiesenen VAGen wie *fimC*, *ompA*, *mat* oder *feoB* ist anzunehmen, dass sie entweder sehr früh in der Phylogenie von *E. coli* entstanden sind, und sich so weit verbreiten konnten, dass sie sehr mobil sind, oder dass sie einen starken evolutionären Vorteil bringen, so dass sie sich sehr schnell verbreitet haben (Johnson, Kaster et al. 2003). In beiden Fällen sind sie zwar für die Diagnostik eines Pathotyps

uninteressant, einige von ihnen könnten jedoch mögliche Ziele für Impfstoffe darstellen (Johnson, Kaster et al. 2003).

Von den, mit einer Pathogenität für den Intestinaltrakt verbundenen, getesteten Genen sind die Gene für ST 1 und 2, LT 1 sowie die Fimbrien 4, 5, 6, 18 und 41 mit ETEC, Intimin mit EPEC und STX 1 und 2 mit STEC assoziiert (Franck, Bosworth et al. 1998; Cornick, Matise et al. 1999; DebRoy and Maddox 2001; Persson, Olsen et al. 2007). Nur jeweils vier der getesteten GE-Isolate waren positiv für das hitzestabile Enterotoxin 1 bzw. Intimin. Für die übrigen Isolate konnten keine VAGe für das Habitat Darm festgestellt werden. Es könnte sich demnach um avirulente Stämme handeln (Turner, Chaudhuri et al. 2006), die entweder nicht die Ursache für die GE waren oder diese nur in Verbindung mit anderen Faktoren auslösen konnten. In anderen Studien, in denen ebenfalls *E. coli*-Isolate von Hunden mit Diarrhö auf die oben genannten Toxine und Fimbrien getestet wurden, konnten diese ähnlich selten nachgewiesen werden (Turk, Maddox et al. 1998; Starcic, Johnson et al. 2002). Interessanterweise jedoch, genau wie in dieser Studie, UPEC-assoziierte VAGe relativ häufig (Starcic, Johnson et al. 2002). Die Autoren diskutieren als Erklärung hierfür mehrere Möglichkeiten. 1. Die Stämme könnten „bifunktional“ sein und sowohl UGT-Infektionen als auch Diarrhö verursachen, 2. könnten die Isolate darmpathogene Stämme sein, die UPEC lediglich ähnlich sind (oder andersherum) oder 3. es sind UPEC-Stämme, die zwar dominierend im Darm sind, jedoch nicht die Ursache der Diarrhö. Die erste Theorie wird durch den Nachweis verschiedener Diarrhö-assoziiierter VAGe in UPEC-Stämmen in einer anderen Studie unterstützt (Abe, Salvador et al. 2008), jedoch konnte dies in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden. Zudem spricht dagegen, dass Burland und Welch nur geringe Übereinstimmungen der Genome der verschiedenen Pathotypen finden konnten (Welch, Burland et al. 2002). Eine weitere Theorie anderer Autoren ist, dass die extraintestinale Virulenz nur „zufällig“ infolge einer Anpassung an das Habitat Darm entstanden ist, da die entsprechenden VAGe hier ebenfalls die Fitness der Bakterien verbessern (Le Gall, Clermont et al. 2007).

Da sich die MLST für epidemiologische Langzeitstudien besonders eignet (Spratt and Maiden 1999; Aanensen and Spratt 2005; Tartof, Solberg et al. 2005; Maiden 2006; Wirth, Falush et al. 2006) wurde diese Methode verwendet um die Verwandtschaft der Isolate untereinander zu ermitteln und diese zusätzlich in die Gesamtpopulation von *E. coli* einordnen zu können.

Da die MLST auf der Sequenzierung hoch konservierter Housekeeping-Gene basiert, ist es möglich die Verwandtschaft zwischen fernverwandten Stämmen, die an unterschiedlichen Orten und zu unterschiedlichen Zeiten isoliert wurden, darzustellen. Im Gegensatz hierzu

eignen sich klonale Analysen, die auf dem sich durch Mutationen und horizontalen Gentransfer schnell verändernden Genom beruhen, nur für nahverwandte Stämme, die örtlich und zeitlich begrenzt isoliert wurden (Wirth, Falush et al. 2006).

Da bisher nur sehr wenige *E. coli*-Isolate von Hunden und Katzen sequenztypisiert wurden, stellen die Ergebnisse dieser Studie eine große Bereicherung für das Wissen über die Epidemiologie pathogener caniner und feliner *E. coli*-Stämme dar. Ebenso wird die Verwandtschaft dieser Stämme mit humanpathogenen Stämmen deutlicher. Dies ist durch das enge Zusammenleben des Menschen mit diesen Haustieren und das damit verbundene Übertragungsrisiko von besonderer Bedeutung.

Bei den 139 Isolaten von Hunden und Katzen war auffällig, dass keiner der sieben mindestens fünfmal vorkommenden STen für eine Erkrankung exklusiv war (Tabelle 12). Mit Ausnahme des ST12 konnte für keinen Sequenztypen ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz zwischen den beiden Erkrankungen nachgewiesen werden. Und auch der ST12 kam zwar mit 18,8 % signifikant häufiger bei den Isolaten von UGTI vor, jedoch mit einer Prävalenz von 7,1 % auch häufig bei den GE-Isolaten. ST73 und ST141 kamen fast gleich häufig bei den GE-Isolaten wie bei den UGT-Isolaten vor. Diese Ähnlichkeit der Verteilung der STen innerhalb der beiden Gruppen von Isolaten wird umso deutlicher, wenn man diese mit der Situation bei den humanen Isolaten vergleicht (Abb. 3), bei denen es mit Ausnahme des ST10 kaum Überschneidungen zwischen den beiden Habitaten gibt.

Interessant ist, dass die nach der MLST-Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) besonders häufig mit humanen UPEC assoziierten ST73 (Zdziarski, Svanborg et al. 2008) (6,4 %) und ST141 (6 %) bei den Haustieren ähnlich häufig im Darm (22,9 % bzw. 8,6 %) wie im UGT nachgewiesen werden konnten. Die im Kot der Tiere ebenfalls mehrfach nachgewiesenen ST12 (7,1 %) und ST80 (5,7 %) konnten ebenfalls, wenn auch mit geringerer Prävalenz (1,8 % bzw. 2,1 %), den humanen UPEC zugeordnet werden

Die am häufigsten mit humanen UPEC assoziierten ST69 (9,3 %) und ST95 (8,9 %) sowie der fünfthäufigste ST131 (5,7 %) konnten dagegen bei den Isolaten vom Tier nicht nachgewiesen werden.

Eine derartige Variabilität, wie sie für die STen der humanen GE-Isolate zu erkennen war konnte bei den Isolaten vom Tier nicht festgestellt werden.

Die UGTI-Isolate vom Tier sind ähnlich stark mit bestimmten Phylotypen assoziiert wie die vom Menschen. Die entsprechenden Phylo- und O-Serotypen finden sich häufig in der normalen Darmflora dieser Tiere (Johnson, Kaster et al. 2003).

Diese Beobachtungen, sowie die Virulenzmuster der GE-Isolate führen zu der Vermutung, dass es sich bei dem dominierenden Stamm im Kot der an Durchfall erkrankten Tiere nicht

um den InPEC-Stamm handelte. In anderen Studien zeigten sich UPEC-Stämme häufig als die dominierenden Stämme im Darm von Hunden (Low, Braaten et al. 1988; Ling, Norris et al. 2001; Johnson, Kaster et al. 2003). Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass bei den meisten GE-Isolaten keine Enterotoxine oder darmspezifische Fimbrien nachzuweisen waren, da die verschiedenen Pathotypen unter den InPEC über das Vorhandensein dieser Toxine und Fimbrien definiert sind (DebRoy and Maddox 2001; Persson, Olsen et al. 2007). In anderen Studien konnten dagegen *E. coli*-Isolate von an GE erkrankten Hunden bzw. Menschen zu fast 50 % Enterotoxin-positiv getestet werden (Prada, Baljer et al. 1991; Hammermueller, Kruth et al. 1995; Bouzari, Jafari et al. 2007). Da P-Fimbrien mit dem Pyelonephritis-assoziierten Pilus (Pap) auch an Rezeptoren im Darm binden, ist es auch möglich, dass die isolierten Stämme an dem Durchfallgeschehen beteiligt waren (Wold, Caugant et al. 1992; Adlerberth, Hanson et al. 1995; Starcic, Johnson et al. 2002) ohne InPEC zu sein. Dass UPEC möglicherweise auch darmpathogen sind, wurde in einer Studie durch den Nachweis anderer mit Diarrhö verbundener Virulenzfaktoren untermauert (Abe, Salvador et al. 2008), der Beweis durch ein in vivo Modell fehlt hier allerdings noch. Da in der genannten Studie gezeigt werden konnte, dass UPEC-Stämme auch für InPEC typische VAGe tragen können, ist es für den Nachweis solcher Stämme wichtig, dass die Isolate aus dem GIT auch in der vorliegenden Studie von an Diarrhö erkrankten Tieren und nicht aus dem Kot gesunder Tiere gewonnen wurden. Für die 69 Isolate von an UGTI leidenden Tieren konnten wir jedoch keine mit InPEC assoziierten VAGe finden.

Auf Grund der deutlichen Zusammenhänge zwischen dem Sequenztyp der Stämme und den O-Serotypen, ist es möglich die Ergebnisse dieser Studie mit den Ergebnissen ähnlicher vorangegangener Studien, die meist nur eine O-Serotypisierung vorgenommen haben, zu vergleichen. So konnten die O-Serogruppen O2, O4, O6, O18, O22 sowie O25 immer wieder mit Infektionen des UGT des Menschen in Zusammenhang gebracht werden (Johnson, Kaster et al. 2003; Lau, Reddy et al. 2008). Durch die deutliche Korrelation dieser Gruppen mit den Sequenztypen ST12, ST73, ST127 sowie ST141 (Tabelle 18) liegt die Vermutung nahe, dass auch dies Stämme waren, für die der Kot von Hund und Katze ein Reservoir darstellt. Zusätzlich ist die Korrelation zwischen der MLST und der Serotypisierung eine Bestätigung dafür, dass die O-Serotypisierung eine relativ aussagekräftige Methode zur Charakterisierung eines *E. coli*-Stammes ist. Sie ist jedoch auf Grund des Austausches, dem äußere Antigene unterliegen, nicht vollkommen zuverlässig. Die beiden häufigsten „Sequenz-O-Typen“ sind ST12-O18 und ST73-O6. Ersterer ist gar nicht und letzterer nur zweimal unter den humanen Stämmen zu finden. In einer Untersuchung an humanen UPEC, es handelte sich um extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-produzierende *E. coli*, eine

besondere klonale Gruppe, war der „Sequenz-O-Typ“ ST131-O25 mit 48,8 % häufig vertreten (Lau, Reddy et al. 2008), dieser konnte hier zwar bei den Isolaten vom Kleintier nicht nachgewiesen werden, jedoch in einer neueren Studie von Ewers et al. bei 5,6 % der Isolate von verschiedenen Haustieren, darunter neun Isolate von Hunden (Ewers, Grobbel et al.). Ob die Verknüpfung dieser Typisierungsmethoden sinnvoll ist muss in nachfolgenden Studien mit mehr Isolaten weiter untersucht werden.

Es konnten im Durchschnitt für die Stämme der Sequenztypen ST80 (19), ST73 (18,5) sowie ST141 (18,3) deutlich mehr mit UPEC assoziierte Gene, und für ST10 (8,4) deutlich weniger VAGe nachgewiesen werden, als für die Gesamtheit der Isolate von Hunden und Katzen (15,8). Die GE- und UGTI-Stämme unterschieden sich in der durchschnittlichen Anzahl an VAGen nur gering (GE: 15,5; UGTI: 16,1). Bei der Betrachtung der Gene *sat*, *tia*, *ireA*, und *iha* mit relativ geringer Prävalenz (zwischen 7,2 % und 28,1 %) fällt auf, dass diese gehäuft in den ST-Komplexen STC73 und STC12 vorkommen. Diese ST-Komplexe korrelieren stark mit den O-Serotypen O6 bzw. O18. Diese „Sequenz-O-Typen“ könnten besonders extraintestinal pathogen sein, da diese VAGe deutlich mit ExPEC assoziiert zu sein scheinen (Ewers, Li et al. 2007).

5.2.1. Habitatspezifität

Betrachtet man die Ergebnisse der MLST und der Sero- und Virulenzgenotypisierung der 139 *E. coli*-Isolate von Hunden und Katzen insgesamt, und vergleicht die Daten der Stämme aus dem UGT mit denen der Stämme aus dem GIT, zeigen sowohl die phylogenetischen Analysen als auch die Studie der VAGe, dass für diese Tiere ihr eigener Kot eine Hauptinfektionsquelle für eine UGTI darstellt. Das heißt, dass dieser ein Reservoir für canine und feline uropathogene *E. coli* ist. Zum Beispiel konnte der auf Grund seines Virulenzgenmusters vermutlich extraintestinal pathogene „Sequenz-O-Typ“ ST73-O6 (s.o.) hauptsächlich (81,8 %) im Kot der Tiere nachgewiesen werden.

In einer anderen Studie wurden von Hunden mit UGTI sowohl aus dem Urin als auch dem Kot *E. coli* isoliert und die Isolate desselben Wirtes jeweils gepaart. Sieben der acht Paare zeigten gleiche DNA-Sequenzen für drei Virulenz-assoziierte Gene und gleiche phänotypische Eigenschaften (Low, Braaten et al. 1988). In einer ähnlichen Studie wurden solche Paare mittels RAPD-Analyse, O-Serotypisierung und Virulenzgenotypisierung verglichen. Bei 20 der 37 Paare waren die jeweiligen Isolate auf der Basis der verwendeten Methoden gleich. Die 17 Kot-Isolate, die sich von dem dazugehörigen Urin-Isolat unterschieden, trugen deutlich weniger VAGe (Johnson, Kaster et al. 2003). Diese Ergebnisse werden durch weitere Studien bestätigt (Yuri, Nakata et al. 1998; Johnson,

O'Bryan et al. 2000; Johnson, Kaster et al. 2003). Generell konnten UPEC-typische VAGe immer wieder in Kot-Isolaten von Hunden nachgewiesen werden (Chen, Wright et al. 2003). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die „Spezielle-Pathogenitäts-Hypothese“ (Johnson, Kaster et al. 2003) für *E. coli*-Stämme von Hund und Katze nicht zutrifft, dass *E. coli* hier keine speziellen Pathotypen bildet, und dass andere Faktoren für die Entwicklung einer Erkrankung durch dieses Bakterium nötig sind, oder dass diese Erreger weitaus vielseitiger sind als bisher angenommen (Starcic, Johnson et al. 2002; Abe, Salvador et al. 2008). Auch in keiner dieser Studien wurde die enge Verwandtschaft von Kotisolaten mit UPEC-Stämmen mittels MLST bestätigt. Für die Betrachtung der Epidemiologie dieser Stämme ist dies jedoch essentiell, da die Phylogenie dieser Erreger nur durch eine Methode eindeutig geklärt werden kann, deren Ergebnisse durch horizontalen Gentransfer nur gering verzerrt werden können.

5.2.2. Zoonosepotential

Beim Vergleich der Ergebnisse der Sequenz- sowie der Serotypisierung der humanen UGTI-Isolate mit denen der animalen Isolate sind Hinweise für ein Zoonosepotential dieser Stämme zu erkennen. Die für humane UPEC typischen O-Serotypen O2, O6 und O25 sind auch die im Darm der Tiere am häufigsten nachgewiesenen. Genauso verhält es sich für die Sequenztypen ST73 und ST141. Die unter den humanen UGTI-Isolaten jedoch am häufigsten vertretenen ST69 und ST95 sowie der vierthäufigste O-Serotyp O1 konnten unter den Tierisolaten nicht gefunden werden. Es mag sein, dass für diese Stämme Hund und Katze kein Reservoir darstellen, nichtsdestotrotz wird das Zoonoserisiko anderer Stämme auch durch die Virulenzgenotypisierung der animalen Isolate bestätigt.

Zum einen ist hier die hohe Prävalenz der für humane UPEC typischen VAGe an sich erwähnenswert, zum anderen die, bis auf wenige Ausnahmen, fast gleichen Prävalenzen dieser VAGe bei den Tierisolaten aus dem GIT, bei denen aus dem UGT und bei den humanen UPEC in einer anderen Untersuchung (Ewers, Li et al. 2007).

Zusätzlich wird diese Theorie in der Literatur immer wieder bestätigt. In vielen Studien wurden Isolate von Menschen mit einer UGTI mit Isolaten von Hunden und zum Teil auch Katzen mit UGTI bzw. mit Isolaten aus dem Kot dieser Tiere verglichen und als sehr ähnlich bis identisch befunden (Low, Braaten et al. 1988; Wilson, Keefe et al. 1988; Yuri, Nakata et al. 1998; Johnson, O'Bryan et al. 2000; Ling, Norris et al. 2001; Starcic, Johnson et al. 2002; Johnson, Kaster et al. 2003). In einer Studie von Johnson et al. wurden von einem Familienhund über drei Jahre, immer während dieser an einer UGTI litt, Urin-Proben entnommen und mit Stuhl-Proben von Familienmitgliedern verglichen, die zur gleichen Zeit entnommen wurden (Johnson, Clabots et al. 2008). Es zeigte sich, dass sich Hunde auch mit

humanen Stämmen infizieren, d.h. die Übertragung zwischen Mensch und Hund kommt in beiden Richtungen vor. Solberg et al. zufolge können Urogenitaltraktinfektionen nicht nur als Einzelerkrankungen, sondern auch als Ausbrüche auftreten (Tartof, Solberg et al. 2005), dies unterstützt die Annahme einer exogenen Infektionsquelle für den Menschen.

Dennoch gibt es auch viele Autoren, die Unterschiede zwischen humanen und animalen UPEC beschreiben (Garcia, Bergmans et al. 1988; Chen, Wright et al. 2003).

Untersuchungen über die Verteilung der *papG*-Allele I bis III und einer eventuell vorhandenen Wirtsspezifität liefern widersprüchliche Ergebnisse. Einige fanden eine Spezifität für Hund und Katze für *papG* III bzw. eine für Menschen für *papG* II (Turk, Maddox et al. 1998; Ling, Norris et al. 2001), andere konnten keine Wirtsspezifität feststellen (Low, Braaten et al. 1988; Johnson, O'Bryan et al. 2000; Fera, Machado et al. 2001).

In den oben erwähnten Studien fehlt jedoch die Bestimmung des phylogenetischen Hintergrundes der Tierisolate, so dass die epidemiologische Bedeutung des Zoonosepotentials dieser Stämme nicht eingeschätzt werden kann. Da keine bisher bekannte Virulenzfaktorkombination exklusiv und essentiell für UPEC ist, kann ein Stamm durch Nachweis dieser VAGe zumindest nicht eindeutig als UPEC klassifiziert werden. Dies bestätigen auch andere Untersuchungen (Johnson, Kaster et al. 2003). Bisher fand eine Klassifizierung meist über die Quelle der Isolierung und den klinischen Vorbericht statt.

Durch die Verwendung der MLST in dieser Studie konnte die enge Verwandtschaft der Isolate von Hunden und Katzen mit humanen UPEC-Stämmen eindeutig belegt werden. Zudem konnte eine hohe Prävalenz von nach ihrem Virulenzgenmuster wahrscheinlich uropathogenen Stämmen bei diesen Haustieren bestimmt werden. Dies ist besonders wichtig für die Einschätzung des Infektionsrisikos für den Menschen.

Für die darmpathogenen *E. coli*-Stämme des Menschen scheinen Hunde und Katzen kein regelmäßiges Reservoir darzustellen, da es hier, mit Ausnahme des ST10 und der jeweils vier auf ST1 bzw. Intimin positiv getesteten Isolate, weder bei der Sero- und Sequenztypisierung noch beim Virulenzfaktormuster Übereinstimmungen gab. Das Zoonoserisiko für eine *E. coli*-Gastroenteritis scheint bei diesen Haustieren gering zu sein.

Zusammengefasst unterstützen die Ergebnisse dieser Untersuchung zwei Annahmen früherer Publikationen. Zum einen, dass der Darm von Hunden und Katzen ein Reservoir für uropathogene *E. coli*-Stämme darstellt und für diese Tiere ihr eigener Darm eine Hauptinfektionsquelle darstellt, und zum anderen, dass diese Stämme auch für den Menschen pathogen sein können.

Den eindeutigen Beweis für die enge Verwandtschaft der Kot- mit den UGT-Isolaten bzw. der animalen mit den humanen Isolaten mittels MLST wurde jedoch nur in dieser Studie erbracht.

Da Hunde und Katzen eng mit dem Menschen zusammenleben und ihr Darm als Reservoir für humane UPEC zumindest sehr wahrscheinlich ist, ist es wichtig zu betonen, dass alle nötigen Hygienemaßnahmen, die zur Vermeidung einer Übertragung von Erregern aus dem Kot dieser Tiere auf den Menschen nötig sind, strikt eingehalten werden sollten.

5.3. Habitatspezifität und Zoonosepotential der Isolate vom Schwein

Auch beim Schwein führen verschiedene *E. coli*-Pathotypen zu intestinalen und extraintestinalen Erkrankungen. Die wichtigsten extraintestinalen durch *E. coli* Infektionen verursachten Erkrankungen beim Schwein sind die Kolisepsis (Neonatale *E. coli*-Septikämie) sowie Urogenitaltraktinfektionen, zu denen als häufigste Formen die coliforme Mastitis (auch Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom (MMA)) sowie die Zystitis mit einer Pyelonephritis als mögliche Komplikation zählen.

Zur Kolisepsis kommt es in der Regel nur bei Ferkeln, die unzureichend kolostrale Antikörper aufgenommen haben, durch parenterale Infektionen (Nabelinfektion). Meistens kommt es nach zwölf bis 48 Stunden zum Tode.

In Sauenbetrieben stellen Harnwegsinfektionen mit einer Prävalenz von 11 bis 48 % und als Ursache von 32,4 % der Todesfälle eine der häufigsten Erkrankungen dar (Carr and Walton 1993; Karg and Bilkei 2002; Krag, Hancock et al. 2008). Entzündungen der Harnorgane finden sich eher bei älteren Sauen und entstehen in der Regel nach einer ascendierenden Infektion der Blase, die sich am häufigsten zum Zeitpunkt der Geburt oder während des Puerperiums im Zusammenhang mit Infektionen des Genitaltraktes entwickelt. *E. coli* stellt für diese Infektionen den häufigsten Erreger dar (Almanjd and Bilkei 2008; Krag, Hancock et al. 2008). Diese Zystitiden werden als prädisponierender Faktor für das MMA-Syndrom angesehen, da sie als Reservoir für koliforme Keime in Frage kommen, die galaktogen in die Milchdrüsen eindringen oder auch ascendierend den Uterus besiedeln können.

Das MMA-Syndrom gehört, mit einer Prävalenz von im Durchschnitt 13 %, einer Mortalität für die Ferkel der erkrankten Sauen von 56 % und als Ursache von 24,5 % der Todesfälle von Muttersauen, weltweit zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Schweinekrankheiten (Hermansson, Einarsson et al. 1978; Backstrom, Morkoc et al. 1984; Karg and Bilkei 2002; Hirsch, Philipp et al. 2003). Bei der Mehrzahl der an MMA erkrankten Sauen lässt sich eine durch koliforme Bakterien verursachte Mastitis (Kolimastitis) mit Hypogalaktie sowie eine Genitaltraktinfektion mit Scheidenausfluss und gestörtem Allgemeinbefinden nachweisen.

Der in diesem Zusammenhang am häufigsten (50 -72 %) isolierte Erreger ist ebenfalls *E. coli*, die hier jedoch auch zu einem großen Anteil mit anderen Erregern in einer Mischinfektion vorkommen (Ross, Christian et al. 1969; Bertschinger, Pohlenz et al. 1977; Ross, Harmon et al. 1983; Korudzhiiski, Bozhkova et al. 1987; Hirsch, Philipp et al. 2003).

Die wichtigsten intestinalen Erkrankungen durch *E. coli*-Infektionen beim Schwein sind die Kolidiarrhö der Saugferkel oder „Koliruhr“ (Enteric colibacillosis, Neonatal diarrhoea (ND)), die Kolidiarrhö der Absatzferkel (Postweaning diarrhoe (PWD)) sowie die Kolienterotoxämie (Ödemkrankheit) (Blanco, Lazo et al. 2006). Die beiden erstgenannten Erkrankungen werden durch ETEC-Stämme ausgelöst, die jedoch zum Teil unterschiedliche Fimbrien sowie unterschiedliche O-Antigene tragen (ND meist mit F5, F6 oder F41 und PWD meist mit F4 oder F18 assoziiert (Zhang, Zhao et al. 2007)).

Diarrhö ist eine der häufigsten Erkrankungen bei Saug- und Absatzferkeln weltweit und ist verantwortlich für 10,8 % der Sterblichkeit unter diesen Tieren. Ein großer Anteil dieser Gastroenteritiden wird durch *E. coli* verursacht (Ngeleka 2002).

Die Ödemkrankheit wird durch Stx2e-produzierende *E. coli* ausgelöst. Es kommt neben einer durch Enterotoxine ausgelösten Diarrhö, nach Aufnahme des Shiga-Toxins in den Blutkreislauf, zur Gefäßschädigung, in deren Folge Ödeme auftreten (Barman, Deb et al. 2008).

5.3.1. Habitatspezifität

Bei den Prävalenzen für die 34 ExPEC-assoziierten sowie den elf InPEC-assoziierten Gene, auf die die 53 Isolate vom Schwein getestet wurden, konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Habitaten UGT und GIT festgestellt werden. Generell konnten wie erwartet etwas höhere Prävalenzen für die meisten ExPEC-assoziierten Gene bei den 23 Isolaten von Schweinen mit UGTI bzw. signifikant höhere für die InPEC-assoziierten Gene bei den 30 Isolaten von Schweinen mit Gastroenteritis ermittelt werden (Tabelle 6 und 7). Einzige Ausnahmen stellten dabei die sechs ExPEC-assoziierten Gene *hlyA* (GE: 63,3 %; UGTI: 8,7 %), *hrlA/hek* (GE: 26,7 %; UGTI: 17,4 %); *Rpai (malX)* (GE: 10 %; UGTI: 4,3 %); *sfa/foc* (GE: 13,3 %; UGTI: 4,3 %); *chuA* (GE: 20 %; UGTI: 8,7) sowie *astA* (EAST 1) (GE: 26,7; UGTI: 8,7) dar, die zwischen 1,5 bis sieben mal häufiger im GIT als im UGT nachgewiesen wurden. Obwohl das Hämolysin *hlyA* nach verschiedenen Untersuchungen klar mit UPEC assoziiert ist und auf der Pathogenitätsinsel II des UPEC Stammes J96 lokalisiert ist (Ewers, Li et al. 2007), konnte es auch immer wieder in intestinalen *E. coli*-Isolaten nachgewiesen werden (Schierack, Steinruck et al. 2006; Wu, Chapman et al. 2007). Auch die Fimbrien *sfa/foc* (S- und F1C-Fimbrien) sind Teil einer UPEC-Pathogenitätsinsel und konnten in einer Studie an 65 humanen UPEC in der Hälfte der Stämme nachgewiesen

werden (Ewers, Li et al. 2007), jedoch konnten auch diese bereits in anderen Studien vermehrt in porcinen intestinalen *E. coli*-Isolaten, besonders in Zusammenhang mit der P-Fimbrie gefunden werden (Maiti, Harel et al. 1993; Johnson, Kuskowski et al. 2003). Das plamidkodierte Enteroaggregative hitzestabile Enterotoxin 1 (EAST-1) ist nicht nur mit ExPEC assoziiert, sondern konnte bereits in vielen verschiedenen *E. coli*-Pathovaren (u.a. ETEC, EPEC und STEC) von Mensch und Tier nachgewiesen werden (Yamamoto and Nakazawa 1997; Choi, Cho et al. 2001; Frydendahl 2002; Ngeleka, Pritchard et al. 2003; Noamani, Fairbrother et al. 2003; Osek 2003) und war in einer Studie, in der 250 porcine intestinale *E. coli*-Isolate auf elf verschiedene InPEC-assoziierte Virulenzfaktoren getestet wurden, mit einer Prävalenz von 65 % der häufigste Virulenzfaktor (Vu-Khac, Holoda et al. 2007). Da die übrigen oben genannten, häufiger in Isolaten aus dem GIT nachgewiesenen VAGE nach bisherigen Untersuchungen als UPEC-assoziiert gelten, ist ihr 1,5 bis dreifach häufigeres Vorkommen im Darm überraschend (Johnson, Kaster et al. 2003; Johnson, Kuskowski et al. 2005; Ewers, Li et al. 2007).

Die übrigen der 34 getesteten ExPEC-assoziierten Gene kamen fast alle deutlich häufiger in den Isolaten aus dem UGT vor.

Bei den InPEC-assoziierten Genen war die Situation genau umgekehrt, hier waren die VAGE mit Prävalenzen von bis zu 50 % für die Isolate aus dem Habitat GIT exklusiv.

Auch nach den Ergebnissen der MLST stellten sich die Isolate aus dem GIT gegenüber denen aus dem UGT als sehr unterschiedlich dar. Hier gab es mit Ausnahme des ST10 keine Übereinstimmungen zwischen den Isolaten der beiden Habitate. 80 % der Isolate aus dem GIT gehörten zu nur drei verschiedenen STen (ST100 (53,3 %), ST10 (13,3 %) und ST1 (13,3 %)). Die STen der Isolate aus dem UGT waren sehr variabel. Der ST 398 kam hier mit einer Prävalenz von 13 % am häufigsten vor.

Vergleicht man die Ergebnisse der MLST sowie der Virulenzgenotypisierung der porcinen Isolate der beiden unterschiedlichen Habitate miteinander, ist eine Habitatspezifität wahrscheinlich. Diese Annahme wird durch andere Studien an *E. coli*-Isolaten von Schweinen unterstützt. So wurden in einer Untersuchung 47 Isolate aus dem Kot von an Durchfall erkrankten Schweinen sowie 158 Kotisolate von gesunden Schweinen auf 36 ExPEC-assoziierte Virulenzfaktoren getestet, jedoch konnten nur acht dieser Virulenzfaktoren nachgewiesen werden (Wu, Chapman et al. 2007). In einer anderen Studie wurden 151 Kotisolate vom Schwein auf 13 ExPEC-assoziierte Virulenzfaktoren getestet, und auch diese Isolate waren für die meisten der getesteten Virulenzfaktoren negativ. Zusätzlich wurden die ECOR-Gruppen dieser Stämme bestimmt und festgestellt, dass sie, im Gegensatz zu ExPEC, die in der Regel zu den ECOR-Gruppen B2 und D gehören, alle zur Gruppe B1 oder A gehörten (Dixit, Gordon et al. 2004).

Die in dieser Studie gewonnenen Daten schließen jedoch den Darm der Schweine als Reservoir für ExPEC nicht aus, da jeweils nur der dominierende Stamm, der höchst wahrscheinlich auch der entsprechende Diarrhö-auslösende Stamm war, isoliert wurde. Jedoch besiedeln in der Regel noch weitere *E. coli*-Stämme den Darm. Die Ergebnisse einiger anderer Studien lassen dies sogar als sehr wahrscheinlich erscheinen. So konnten im Kot gesunder Schweine viele ExPEC-ähnliche Stämme gefunden werden (Schierack, Walk et al. 2008). In einer anderen Studie trugen 5,9 % von 204 *E. coli*-Isolaten von an Durchfall erkrankten Schweinen nur ExPEC-assoziierte und keine InPEC-assoziierten Gene (Toth, Oswald et al. 2000). Andere Autoren bezeichneten Stämme aus dem GIT von Schweinen auf Grund des Nachweises verschiedener Virulenzfaktoren als ExPEC und testeten diese daraufhin auf noch weitere ExPEC-assoziierten Gene positiv (Johnson, Kuskowski et al. 2003). In mehreren weiteren Studien konnten extraintestinal pathogene Eigenschaften in intestinalen Isolaten von Schweinen nachgewiesen werden (Harel, Fairbrother et al. 1993; Maiti, Harel et al. 1993; Dozois, Clement et al. 1997; Toth, Oswald et al. 2000; Chapman, Wu et al. 2006).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie, in der bei den Isolaten von Schweinen mit UGTI keine der InPEC-assoziierten Gene nachgewiesen werden konnten, kamen diese bei einer anderen Untersuchung an *E. coli*-Isolaten von der gleichen Erkrankung bei Schweinen neben einigen ExPEC-assoziierten Genen vor. Dies führen die Autoren darauf zurück, dass UGTIs bei Schweinen normalerweise durch Bakterien aus dem Darm entstehen, die in den UGT aufsteigen (de Brito, Leite et al. 1999), was jedoch nicht gleichbedeutend mit einem dauerhaften Reservoir dieser Stämme im Darm der Schweine ist.

5.3.2. Zoonosepotential

Die Prävalenzen, die in dieser Studie für die 34 ExPEC-assoziierten Gene bei Isolaten von Schweinen mit UGTI ermittelt wurden, liegen bis auf wenige Ausnahmen alle deutlich niedriger als die Prävalenzen, die in einer anderen Studie für die selben VAGe bei Isolaten von Menschen mit UGTI (UPEC) nachgewiesen wurden (Ewers, Li et al. 2007). Dies ist besonders ausgeprägt bei den VAGen *iha*, *afa/draBC*, *GimB-Insel*, *ireA*, *tia* und *fyuA*, die bei den Isolaten vom Schwein nicht vorkamen und bei den humanen Isolaten der oben erwähnten Studie Prävalenzen von 22,7 %, 6,1 %, 9,1 %, 19,7 %, 31,8 % und 21,2 % zeigten. Die für die Virulenz von UPEC als sehr entscheidend beschriebenen VAGe *papC* und *sfa/foc* wurden bei den humanen Isolaten wie erwartet mit Prävalenzen von jeweils 50 % häufig nachgewiesen, kamen jedoch bei den porcinen Isolaten nur selten vor (jeweils 4,3 %).

Bei den Ergebnissen der MLST für die Isolate vom Schwein (GE und UGTI) in dieser Studie und den STen der Isolate vom Menschen (GE und UGTI) der MLST-Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) gibt es, mit Ausnahme des ST10 (GE/Ms: 4 %; GE/Sw: 13,3 %; UGTI/Ms: 5 %; UGTI/Sw: 8,7 %) unter den mehr als einmal vorkommenden STen keine Übereinstimmungen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Untersuchung auf ein geringes Zoonosepotential der Isolate vom Schwein bezüglich humaner UGTIs hin. Nur ein Stamm (ST625) aus dem UGT eines Schweins, der sowohl *papC* als auch *hylA*, *sfa/foc* und *cnf1* positiv war, wies mit 21 ExPEC-assoziierten VAGe ein Zoonosepotential auf. Die übrigen Stämme trugen im Durchschnitt 8,1 (3-21) ExPEC-assoziierte Gene. Die gleiche Schlussfolgerung lassen auch die Ergebnisse anderer Untersuchungen zu (Wu, Chapman et al. 2007). In einer Studie konnten nicht nur wenige der mit humanen UPEC assoziierten Gene in intestinalen *E. coli*-Isolaten von Schweinen nachgewiesen werden, sondern das Zoonosepotential auch auf Grund von Phylogenetischen Analysen sehr gering eingeschätzt werden (Dixit, Gordon et al. 2004). In einer der wenigen Untersuchungen an porcinen UPEC Stämmen wurden deutliche Unterschiede hinsichtlich der Virulenzfaktoren zu humanen UPEC gefunden. Unter anderem exprimierte nur eines der Isolate funktionelle P-Fimbrien und keines der Isolate war F1C-Fimbrien (*foc*) sowie nur 35 % der Isolate *fyuA* positiv. Im Gegensatz zu humanen UPEC, die für dieses Gen Prävalenzen von 82 – 99 % zeigten (Takahashi, Kanamaru et al. 2006; Houdouin, Bonacorsi et al. 2007). Zusätzlich wurde auch in dieser Studie eine phylogenetische Untersuchung vorgenommen, die ergab, dass alle porcinen UPEC Stämme zu den ECOR-Gruppen A und B1 gehörten. Humane UPEC gehören in der Regel zu den ECOR-Gruppen B2 und D (Krag, Hancock et al. 2008).

Auf Grund der sehr ähnlichen Anatomie und Physiologie des humanen und porcinen UGT, gehen allerdings viele Autoren davon aus, dass humane und porcine UPEC hinsichtlich ihrer VAGe ähnlich sein müssen (Krag, Hancock et al. 2008).

Viele Studien sprechen schließlich auch dafür, dass Schweine ein Reservoir für human-pathogene UPEC sind (Harel, Fairbrother et al. 1993; Dozois, Clement et al. 1997; Martins, Martinez-Rossi et al. 2000; Toth, Oswald et al. 2000; Toth, Oswald et al. 2000; Girardeau, Lalioui et al. 2003; Johnson, Kuskowski et al. 2003; Chapman, Wu et al. 2006; Schierack, Walk et al. 2008). In einer Studie an porcinen UPEC-Stämmen, in der diese auf verschiedene UPEC-assoziierte Gene getestet wurden, zeigten sich für diese VAGe sehr ähnliche Prävalenzen wie in humanen UPEC. Allerdings trugen auch 16,1 % bzw. 22,6 % der Stämme Gene für die Enterotoxine LT und Stx1 (de Brito, Leite et al. 1999). In einer Untersuchung in der ebenfalls porcine ExPEC auf 19 ExPEC-assoziierte Gene getestet wurden, wurde insbesondere für alle Stämme das *papG*-Allel III nachgewiesen, welches stark mit *E. coli*-Isolaten von humanen Zystitiden verbunden ist (Dezfulian, Batisson et al.

2003). Für einige porcine und humane *E. coli*-Isolate der Serogruppe O78, extraintestinalen sowie intestinalen Ursprungs, konnte mittels Vergleich verschiedener phänotypischer Eigenschaften sowie einiger Proteine eine Verwandtschaft festgestellt werden (Cherifi, Contrepolis et al. 1994).

Fünf Pathotypen von *E. coli* sind klar mit Diarrhö beim Menschen assoziiert. Dies sind Enteropathogene *E. coli* (EPEC), charakterisiert durch das Adhäsin Intimin (*eae*), Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), charakterisiert durch *aatA*, einem Teil einer Genkassette, die für ein spezifisches ATP-bindendes Transportsystem kodiert (Nishi, Sheikh et al. 2003) sowie dem häufigen Vorkommen des EAST-1-Toxins (*astA*) (Yamamoto and Echeverria 1996), Enterotoxische *E. coli* (ETEC), charakterisiert durch hitzestabile (ST-1 und ST-2) und hitzelabile Enterotoxine (LT), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), charakterisiert durch das Invasivplasmid-Antigen H (*ipaH*) sowie Shiga-Toxin-bildende *E. coli* (STEC), charakterisiert durch Shiga-Toxine (Stx1 und Stx2) (Aranda, Fagundes-Neto et al. 2004; Hien, Scheutz et al. 2008). Einige dieser Virulenzfaktoren konnten bei den Isolaten von Schweinen mit GE mit hoher Prävalenz (LT: 50 %; ST-2: 46,7 %, ST-1: 33,3 %; EAST1: 26,7 %; Stx2: 23,3 %) nachgewiesen werden. Intimin sowie das Shiga-Toxin 1 kamen bei diesen Isolaten nicht vor. Auf die beiden übrigen VAGe (*aatA* und *ipaH*) wurde nicht getestet, da die entsprechenden Pathovaren nur beim Menschen eine Rolle spielen.

Die Prävalenzen, die für die InPEC-assoziierten Fimbrien ermittelt wurden, entsprechen in ihrem Verhältnis den Ergebnissen anderer Studien (Moon, Hoffman et al. 1999; Zhang, Zhao et al. 2007). Diese sind jedoch wirtsspezifisch und spielen für die Virulenz beim Menschen wahrscheinlich keine Rolle.

Auf Grund des Nachweises der auch für humane InPEC typischen VAGe ist ein Zoonosepotential bezüglich humaner Gastroenteritiden nicht auszuschließen.

Durch den Nachweis eines Shiga-Toxins können 23,3 % der Isolate von Schweinen mit GE als STEC eingeordnet werden, jedoch müssen diese für den Menschen nicht pathogen sein. Nur bestimmte STEC-Stämme führen beim Menschen zu Erkrankungen. In einer Studie wurden humane mit porcinen STEC verglichen und sowohl Unterschiede in ihrem VAG-Profil als auch in Zellversuchen, in denen die humanen STEC nur an humane Zellen und die porcinen STEC nur an porcine Zellen adhärten, festgestellt (Ramboarina, Fernandes et al. 2005). Dies lässt auf eine Wirtsspezifität der Stämme schließen. Auch andere Studien sprechen gegen ein Reservoir für humanpathogene STEC im Schwein (Caprioli, Morabito et al. 2005; Oporto, Esteban et al. 2008). Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass Schweine sogar den für den Menschen hochpathogenen Serotyp O157:H7 in sich tragen können (Cornick and Helgerson 2004). Außerdem wurden Stx2e-positive STEC, die die

Erreger der Ödemkrankheit der Schweine darstellen, bereits von Menschen mit Diarrhö und dem Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS) isoliert (Fratamico, Bagi et al. 2004).

Auf Grund der hohen Wirtsspezifität der Kolonisationsfaktoren (Ms: CFA/I bis CFA/IV; Sw: F4, F5, F6, F18 und F41) geht man davon aus, dass ETEC-Stämme von Tieren mit diesen VAGen für Menschen nicht pathogen sind (Blanco, Blanco et al. 1995). Für F17 konnte jedoch auch eine Adhäsion an humane Zellen festgestellt werden (Le Bouguenec and Bertin 1999).

EPEC-Stämme konnten unter den porcinen intestinalen Isolaten nicht gefunden werden (Intimin-Prävalenz = 0), was gegen das Schwein als Reservoir für EPEC spricht. Dies war in anderen Untersuchungen jedoch nicht der Fall, in denen diese mit einer Prävalenz von 17,6 % bei Schweinen isoliert werden konnten (Krause, Zimmermann et al. 2005; Cheng, Sun et al. 2006; Chen, Zhao et al. 2008).

Auf Grund der in dieser Arbeit bei den GE-Isolaten des Schweines nachgewiesenen Gene für bestimmte Enterotoxine, die auch beim Menschen Durchfälle auslösen können, sollte man davon ausgehen, dass der Darm des Schweins potentiell humanpathogene *E. coli*-Stämme beherbergen kann. Das heißt, dass ein Zoonoserisiko hinsichtlich einer GE beim Schwein nicht ausgeschlossen werden kann.

5.4. Habitatspezifität und Zoonosepotential der Isolate vom Rind

E. coli verursacht beim Rind ebenfalls intestinale und extraintestinale Erkrankungen. Die wichtigste intestinale Erkrankung ist hier die Neonatale Kälberdiarrhö (Koliruhr). Die Erreger dieser Erkrankung sind in der Regel ETEC, die jedoch häufig auch als Mischinfektion zusammen mit Rota- und Coronaviren sowie Cryptosporidien auftreten (Eichhorn, Bachmann et al. 1983; Ok, Guler et al. 2009). Neben den Enterotoxinen (häufig ST-1) sind die Fimbrien F5, F17 und F41 wichtige Virulenzfaktoren (Ok, Guler et al. 2009). In Infektionsversuchen ließ sich Diarrhö bei Kälbern auch durch STEC auslösen (Moxley and Francis 1986). Es kommen auch Stämme mit Zytonekrosefaktor 2 (*cnf2*) vor.

Die bedeutsamsten extraintestinalen durch *E. coli*-Infektionen verursachten Erkrankungen beim Rind sind die Koliseptikämie der Kälber, die Kolimastitis der Kühe sowie Urogenitaltraktinfektionen. Die Koliseptikämie tritt in den ersten Lebensstagen auf und entsteht bei Kälbern mit mangelhafter Versorgung mit kolostralen Antikörpern über Infektionen des GIT oder des Nasen-Rachen-Raumes. Die Kolimastitis tritt meist akut im Zusammenhang mit Allgemeinstörungen auf und wird wahrscheinlich durch fäkale Kontamination verursacht (Passey, Bradley et al. 2008).

Zystitiden und Pyelonephritiden entstehen bei Rindern meist durch ascendierende Infektionen mit *E. coli* oder Corynebakterien (Yeruham, Elad et al. 2006). UGTI erreichen bei laktierenden Kühen eine Morbidität von 0,3 bis 10,4 %, von denen 18 bis 47 % auf Grund der Erkrankung abgehen (Markusfeld, Nahari et al. 1989; Rebhun, Dill et al. 1989; Herenda, Dukes et al. 1990; Yeruham, Elad et al. 2004; Yeruham, Elad et al. 2006). *E. coli* ist mit einer Prävalenz von 31,5 % bis 78,3 % hier der Haupterreger (Franz, Winter et al. 2004; Yeruham, Elad et al. 2004; Yeruham, Elad et al. 2006).

5.4.1. Habitatspezifität

Die 34 ExPEC-assoziierten Gene konnten bei den 68 Isolaten von Rindern mit Gastroenteritis mit Prävalenzen von 0 bis 100 % nachgewiesen werden. Es handelt sich bei den wenigen über 80 % nachgewiesenen jedoch um VAGe, die fast jeder *E. coli*-Stamm trägt, und bei den 21, mit einer Prävalenz von unter 20 % nachgewiesenen, VAGe überwiegend um stärker mit ExPEC-assoziierte Gene. So kamen die VAGe *cnf1*, *afa/draBC*, *sat*, *neuC*, *iha*, *sitD* (chromosomal) sowie *GimB* überhaupt nicht und die VAGe *sfa/foc*, *ibeA*, *vat*, *pic* sowie *Rpai* (*malX*) mit Prävalenzen von 1,5 bis 2,9 % nur sehr selten vor. Allerdings wurde *papC* mit einer Prävalenz von 35,3 % relativ häufig gefunden.

Bei der Betrachtung der MLST-Daten für die Isolate vom Rind fällt auf, dass mit Ausnahme des ST10, der hier der häufigste (22,1 %) nachgewiesene ST war und auch unter humanen UPEC vorkommt, keiner der mehr als zweimal nachgewiesenen STen mit humanen UPEC assoziiert ist. Zu bovinen UPEC-Stämmen liegen in der MLST-Datenbank leider keine Daten vor. Zweithäufigster ST unter den Isolaten von Rindern mit GE war ST167 (14,7 %), der ebenfalls zum ST-Komplex 10 gehört.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der MLST und der Virulenzgenotypisierung auf ein geringes uropathogenes Potential der Isolate aus dem GIT des Rindes hin. Dies macht den Darm der Rinder als Reservoir für bovine UPEC unwahrscheinlich. Möglich wäre jedoch dass UGTI bei Rindern durch „normale“ intestinale *E. coli* verursacht werden, die keine Spezifität für das Habitat UGT aufweisen. So wurden in einem bovinen ETEC-Stamm mehrere ExPEC-assoziierte Gene gefunden (Wu, Chapman et al. 2007). In einer anderen Studie konnten in bovinen ExPEC sowohl ExPEC- als auch InPEC-assoziierte Gene und zusätzlich für intestinale *E. coli* typische O-Antigene gefunden werden (Girardeau, Lalioui et al. 2003). Leider konnten keine Daten zu Prävalenzen von ExPEC-assoziierten VAGen in bovinen UPEC-Stämmen gefunden werden. Auch für diese Studie standen keine *E.coli*-Isolate von Rindern mit UGTIen zur Verfügung.

Viele Untersuchungen sprechen jedenfalls dafür, dass auch bei der UGTI des Rindes der eigene Kot der Tiere die Infektionsquelle darstellt (Yeruham, Elad et al. 2006). Es konnten

immer wieder ExPEC-assoziierte Gene in bovinen intestinalen *E. coli*-Isolaten nachgewiesen werden (Harel, Daigle et al. 1991; Harel, Fairbrother et al. 1993; Maiti, Harel et al. 1993; Mainil, Jacquemin et al. 1997; Bertin, Martin et al. 1998; Girardeau, Lalioui et al. 2003; Johnson, Kuskowski et al. 2003).

5.4.2. Zoonosepotential

Vergleicht man die Prävalenzen, die in dieser Studie für die ExPEC-assoziierten Gene bei den Isolaten von Rindern ermittelt wurden mit denen bei humanen UPEC einer anderen Studie, wird deutlich, dass die meisten der VAGe bei den humanen Isolaten um ein Vielfaches häufiger nachweisbar waren (Ewers, Li et al. 2007). Besonders deutlich wird dies bei den VAGen *Rpai* (*malX*) (Rd: 2,9 %; Ms: 65,2 %), *sfa/foc* (Rd: 1,5 %; Ms: 50 %), *cnf1* (Rd: 0 %; Ms: 31,8 %), *sitD* (chromosomal) (Rd: 0 %; Ms: 56,1 %) sowie *vat* (Rd: 1,5 %; Ms: 54,5 %). Die drei erstgenannten gelten als besonders wichtig für die Pathogenität von UPEC (Johnson 1991; Johnson and Stell 2000; Johnson and Russo 2002; Johnson, Scheutz et al. 2005). Nur sechs der 34 getesteten Gene kommen häufiger bei den Isolaten vom Rind vor als in humanen UPEC, zudem sind hier die Unterschiede weniger ausgeprägt.

Die Isolate vom Rind wiesen wesentlich weniger InPEC-assoziierte VAGe auf als die Isolate von Schweinen mit GE. Von den Enterotoxinen konnten ST 1, ST 2 und Stx2 mit Prävalenzen von 8,8 %, 1,5 % und 1,5 % nachgewiesen werden. Bei den Adhäsinen waren dies F5 (8,8 %), F41 (7,4 %) sowie Intimin (4,4 %).

Bei den STen, die für die bovinen Stämme bestimmt wurden, gab es, mit Ausnahme des ST10, weder mit humanen UPEC noch mit intestinalen humanen Stämmen der MLST-Datenbank Überschneidungen.

Es gibt einige Studien, die den Rinderdarm als mögliches Reservoir für humane UPEC in Betracht ziehen (Harel, Fairbrother et al. 1993; Mainil, Jacquemin et al. 1997; Bertin, Martin et al. 1998; Dezfulian, Batisson et al. 2003; Johnson, Kuskowski et al. 2003; Yeruham, Elad et al. 2006). In einer Untersuchung, in der neben humanen ExPEC auch drei bovine *E. coli* sequenztypisiert wurden, konnte einer dieser bovinen Stämme dem unter den humanen Stämmen mit 51,9 % häufigsten Sequenztyp ST69 zugeordnet werden (Tartof, Solberg et al. 2005). In einer Studie wurde die Sequenz des Gens für den Zytonekrosefaktor 1 (*cnf1*) eines bovinen *E. coli*-Isolates mit der eines humanen Isolates verglichen und als sehr ähnlich erkannt (Horne, Goplin et al. 2004). In einer anderen Studie konnte eine klonale Verwandtschaft zwischen bovinen und humanen ExPEC erkannt werden (Cherifi, Contrepolis et al. 1994). In einer weiteren Untersuchung stimmten bovine und humane Isolate nicht nur in ihrem Profil der ExPEC-assoziierten VAGe, sondern auch in ihren O-Serotypen überein (Girardeau, Lalioui et al. 2003).

Dennoch lassen die Ergebnisse dieser Studie, in der erstmals eine größere Anzahl boviner *E. coli*-Isolate sequenztypisiert und auf ExPEC-assoziierte Gene getestet wurde, das Zoonosepotential der Isolate vom Rind hinsichtlich einer UGTI als gering erscheinen.

Es gilt allerdings als sicher, dass der Darm von Rindern ein Reservoir für die für Menschen hochpathogenen Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) darstellt (Wasteson 2001; Fairbrother and Nadeau 2006; Oporto, Esteban et al. 2008). Diese Erreger zählen zu den STEC und führen bei Rindern in der Regel zu keiner Symptomatik. Beim Menschen können sie jedoch zu hämorrhagischer Colitis sowie zum Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS) (bei ca. 5 bis 10 % der Patienten) bis hin zum Tod führen und gehören weltweit zu den wichtigsten Erregern von Lebensmittelinfektionen. In Deutschland wird die Inzidenz auf 13 Fälle pro 100.000 Einwohner geschätzt (Mead and Griffin 1998; Baljer and Wieler 1999). In den USA führen STEC zu geschätzten 110.000 Krankheitsfällen pro Jahr (Mead, Slutsker et al. 1999). Die meisten ernstesten Erkrankungen und Ausbrüche werden ausgelöst durch den Serotyp O157:H7 (Gyles 2007). Jedoch sind auch andere Serotypen der STEC für den Menschen pathogen. In vielen verschiedenen Studien wurden für STEC im GIT von Rindern Prävalenzen zwischen 4,2 und über 50 % festgestellt (Sanz, Vinas et al. 1998; Baljer and Wieler 1999; Leomil, Aidar-Ugrinovich et al. 2003; Paiba, Wilesmith et al. 2003; Wani, Bhat et al. 2003; Aidar-Ugrinovich, Blanco et al. 2007; Oporto, Esteban et al. 2008). Für den Serotyp O157:H7 lagen diese zwischen 0 und 28 % (Sanz, Vinas et al. 1998; Johnsen, Wasteson et al. 2001; Cornick and Helgerson 2004; Aidar-Ugrinovich, Blanco et al. 2007; Jelcic, Hufner et al. 2008; Oporto, Esteban et al. 2008) (Johnsen, Wasteson et al. 2001).

In dieser Studie konnten allerdings unter den 68 Isolaten vom Rind nur ein Shiga-Toxin positiver Stamm und kein Stamm der Serogruppe O157 gefunden werden.

Jedoch konnten 10,3 % der Isolate durch den Nachweis der Enterotoxine ST 1 oder ST 2 den ETEC sowie 4,4 % durch den Nachweis von Intimin den EPEC zugeordnet werden. Es ist möglich, dass diese Stämme für den Menschen pathogen sind, auch wenn die entsprechenden STen, mit Ausnahme des ST10, bei Isolaten von Menschen mit GE bisher nicht gefunden wurden. Andere Studien kommen zu dem Schluss, dass Rinder nicht nur ein Reservoir für STEC, sondern ebenso für EPEC und ETEC sind (Nagy and Fekete 1999; Wani, Bhat et al. 2003; Blanco, Schumacher et al. 2005; Yuste, De La Fuente et al. 2006; Yuste, Orden et al. 2008). Die Prävalenzen, die für diese Pathotypen beim Rind festgestellt wurden, sind sehr unterschiedlich. In einer Untersuchung lag diese bei 10,4 % für EPEC (Krause, Zimmermann et al. 2005), in einer anderen konnten sogar bei 91 % der untersuchten Kälber Intimin-positive *E. coli* isoliert werden, von denen die meisten Shiga-Toxin negativ waren (China, Pirson et al. 1998).

In einer anderen Studie wurde jedoch nachgewiesen, dass Intimin-positive bovine *E. coli* mit entsprechenden humanen *E. coli* nicht verwandt sind (Uber, Trabulsi et al. 2006). Zusätzlich

konnten in unserer Studie für 8,8 bzw. 7,4 % der bovinen Isolate die wirtsspezifischen Fimbrien F5 und F41 nachgewiesen werden. Es ist jedoch möglich, dass diese Stämme zusätzlich auch humanspezifische Kolonisationsfaktoren tragen.

Bei Betrachtung der für die Isolate vom Rind ermittelten STen erscheint das Zoonosepotential hinsichtlich humaner Gastroenteritiden gering, da es hier mit Ausnahme des ST10 keine Übereinstimmungen zwischen den humanen und den bovinen GE-Isolaten gibt.

5.5. Fazit

Diese Arbeit kommt, in Übereinstimmung mit zahlreichen anderen Studien, jedoch erstmals basierend auf einer eindeutigen und vergleichbaren Typisierungsmethode, der MLST, zu folgenden Ergebnissen:

- Hunde und Katzen scheinen sich bei einer durch *E. coli* ausgelösten UGTI häufig über ihren eigenen Kot zu infizieren, da ihr Darm ein Habitat für canin- und felinpathogene UPEC ist.
- Der Darm der Heimtiere Hund und Katze ist als dauerhaftes Reservoir für humanpathogene UPEC sehr wahrscheinlich, was insbesondere durch den engen Kontakt dieser Tiere zum Menschen ein hohes Zoonoserisiko in sich birgt.
- Im Gegensatz hierzu scheint er kein Reservoir für humanpathogene InPEC zu sein, so dass das Zoonoserisiko hinsichtlich einer Gastroenteritis bei diesen Spezies als gering eingeschätzt wird.
- Auch wenn es sich bei einer UGTI des Schweins höchst wahrscheinlich auch meist um eine ascendierende fäkale Infektion handelt, scheint der Darm dieser Tiere kein dauerhaftes Reservoir für porcine UPEC darzustellen.
- Das Zoonoserisiko wird bei dieser Spezies hinsichtlich einer UGTI als gering eingeschätzt.
- Ein Zoonoserisiko bezüglich einer GE ist auf Grund der nachgewiesenen VAGe nicht auszuschließen, jedoch nach den Ergebnissen der MLST nicht wahrscheinlich.
- Die bovinen Isolate scheinen ein geringes uropathogenes Potential aufzuweisen, da jedoch wenig über die Eigenschaften boviner UPEC bekannt ist, kann dieses für Rinder nicht ausgeschlossen werden.
- Das Zoonoserisiko wird hinsichtlich einer UGTI auch bei dieser Spezies als gering eingeschätzt.

- Trotz der allgemein bekannten Tatsache, dass Rinder ein Reservoir für humanpathogene EHEC darstellen, konnten in dieser Studie kaum Hinweise für ein Zoonosepotential der *E. coli*-Isolate vom Rind gefunden werden.

An der Tatsache, dass für jedes sechste Isolat ein neuer ST entdeckt werden konnte, wird deutlich, dass die MLST-Datenbank noch lange kein vollständiges Bild der *E. coli*-Population liefert, und dass noch viele Isolate von vielen unterschiedlichen Wirten und Erkrankungen sowie aus der Umwelt sequenztypisiert werden müssen. Da die Evolution dieser Spezies immer weiter geht, wird das Bild zeitverzögert sein. Dennoch wird sich durch die Phylogenie der Gesamtpopulation viel über die Epidemiologie der einzelnen Pathotypen sagen lassen.

6. Zusammenfassung

Molekulare epidemiologische Untersuchungen von klinischen *Escherichia coli*-Isolaten unterschiedlicher Wirtstierspezies

In dieser Studie wurden 260 *E. coli*-Isolate von Hunden, Katzen, Schweinen und Rindern mit einer Urogenitaltraktinfektion (UGTI) (Hd / Kz: n = 69; Sw: n = 23) bzw. einer Gastroenteritis (GE) (Hd / Kz: n = 70; Sw: n = 30; Rd: n = 68) mittels O-Serotypisierung, Virulenzgenotypisierung und Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) genauer charakterisiert und mit humanen Isolaten entsprechender Erkrankungen aus der MLST-Datenbank für *E. coli* der University College Cork verglichen (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). Die Isolate von Hunden und Katzen konnten 23 verschiedenen Serotypen zugeordnet werden, jedoch 60% der Stämme gehörten zu einer von acht Serotypen (O2, O4, O6; O18, O21, O22, O25, O74). Mit Ausnahme der Serotypen O2 und O74, die nur im Darm bzw. Urogenitaltrakt (UGT) nachgewiesen werden konnten, waren die anderen bei beiden Erkrankungen vorhanden. Viele dieser O-Serotypen werden als typisch für humane UPEC betrachtet, was auch durch die humanen Isolate der MLST-Datenbank bestätigt wurde.

Von den insgesamt 45 verschiedenen Virulenz-assoziierten Genen (VAGen), auf die die Isolate mittels verschiedener Multiplex-Polymerase-Kettenreaktionen (MP-PCR) getestet wurden, wird die Mehrzahl (34) mit extraintestinalen Infektionen assoziiert. 11 dieser VAGe gelten als charakteristisch für intestinal pathogene *E. coli* (InPEC). Bei den 139 Isolaten von Hunden und Katzen unterschieden sich die Prävalenzen, die für diese VAGe festgestellt werden konnten zwischen den beiden Erkrankungen kaum. Zudem waren sie den Prävalenzen, die in einer anderen Studie für dieselben VAGe bei humanen UPEC gefunden wurden, sehr ähnlich. Zwischen den *E. coli*-Isolaten aus dem UGT des Schweins und denen aus dem GIT waren dagegen deutliche Unterschiede zu erkennen, ebenso zwischen den porcinen bzw. bovinen Isolaten und denen des Menschen.

Die Ergebnisse der O-Sero- sowie der Virulenzgenotypisierung konnten durch die Ergebnisse der Multilocus-Sequenztypisierung bestätigt werden, so dass als Schlussfolgerung der Darm der Heimtiere als Infektionsquelle für durch *E. coli* verursachte UGTI sowohl der Tiere selbst als auch des Menschen als bestätigt angesehen, sowie das Zoonoserisiko hinsichtlich dieser Erkrankung für Schwein und Rind als gering eingeschätzt wurde. Bezüglich Gastroenteritiden scheinen die *E. coli*-Isolate von Hunden und Katzen kein Zoonoserisiko darzustellen, hingegen konnte ein gewisses Zoonosepotential der GE-Isolate vom Schwein und Rind nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse vieler Studien gehen mit den Ergebnissen dieser Arbeit konform, jedoch kommen auch immer wieder Studien zu entgegengesetzten Schlussfolgerungen. Kaum eine dieser Studien basiert auf der MLST, und verfügt damit über eine zweifellose phylogenetische Einordnung der untersuchten Isolate, wodurch deren Aussagekraft eingeschränkt ist.

7. Summary

moleculare epidemiological examinations of clinical *Escherichia coli*-isolates of different host's species

In this study 260 *E. coli*-isolates of dogs, cats, pigs and cattle with urinary tract infection (UGTI) (Hd / Kz: n = 69; Sw: n = 23) or a gastroenteritis (GE) (Hd / Kz: n = 70; Sw: n = 30; Rd: n = 68) became more exactly characterized by means of O-serotyping, virulencegenotyping and multilocus-sequencetyping (MLST), and were compared to human isolates of suitable diseases from the MLST data bank for *E. coli* of the University college of Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>). The isolates of dogs and cats could be assigned to 23 different serotypes. However, 60% of the strains belonged to one of eight serotypes (O2, O4, O6; O18, O21, O22, O25, O74). With the exception of the Serotypes O2 and O74, which could be proved only in the bowel or urinary tract (UGT), the others existed with both diseases. Many of these O-Serotypes are considered as typical for human UPEC, what was also confirmed by the human isolates of the MLST data base.

Of the altogether 45 different virulence-associated genes (VAGs), on which the isolates were tested by means of different multiplex polymerase chain reactions (MP-PCR), the majority (34) is associated by extraintestinal infections. 11 of these VAGs are considered as typical for intestinal pathogen *E. coli* (InPEC). The prevalences, which could be identified for these VAGs at the 139 isolates of dogs and cats, differed hardly between both diseases. Besides, they were very similar to the prevalences which were found in another study with human UPEC for the same VAGs. Between the *E. coli*-isolates from the UGT of the pig and those from the GIT clear differences were to be recognized against it, also between porcine or bovine isolates and to those of the human beings.

The results of O-serotyping as well as virulencegenotyping could be confirmed by the results of the Multilocus-sequencetyping, so that, as a conclusion, the bowel of the home animals was looked as an infection spring for *E. coli* caused UGTI of the animals as well as the human beings as confirmed. And the zoonotic risk was estimated, concerning this disease, in case of pig and cattle as low. With regard to gastroenteritis the *E. coli*-isolates of dogs and cats seem to show no zoonotic risk. In contrast, a certain zoonotic potential of the GE-isolates of pig and cattle could not be excluded.

The results of many studies go with the results of this work correspondent, however, other studies come over and over again to opposite conclusions. No of these studies is based on the MLST, and disposes with it of an indubitable phylogenetic classification of the examined isolates, so their explanatory power is limited.

8. Literaturverzeichnis

Aanensen, D. M. and B. G. Spratt (2005). "The multilocus sequence typing network: mlst.net." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W728-33.

Abe, C. M., F. A. Salvador, et al. (2008). "Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*." FEMS Immunol Med Microbiol **52**(3): 397-406.

Abraham, J. M., C. S. Freitag, et al. (1985). "An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5724-7.

Acheson, D. W., J. Reidl, et al. (1998). "In vivo transduction with shiga toxin 1-encoding phage." Infect Immun **66**(9): 4496-8.

Adlerberth, I., L. A. Hanson, et al. (1995). "Adhesins of *Escherichia coli* associated with extra-intestinal pathogenicity confer binding to colonic epithelial cells." Microb Pathog **18**(6): 373-85.

Adu-Bobie, J., G. Frankel, et al. (1998). "Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens." J Clin Microbiol **36**(3): 662-8.

Agin, T. S. and M. K. Wolf (1997). "Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine." Infect Immun **65**(1): 320-6.

Aguero, M. E., L. Aron, et al. (1984). "A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis." Infect Immun **46**(3): 740-6.

Aidar-Ugrinovich, L., J. Blanco, et al. (2007). "Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil." Int J Food Microbiol **115**(3): 297-306.

Almanjd, P. and G. Bilkei (2008). "Evaluation of pyelonephritis in culled indoor and outdoor high parity sows." Dtsch Tierarztl Wochenschr **115**(1): 34-7.

Amezcuca, R., R. M. Friendship, et al. (2002). "Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns." Can J Vet Res **66**(2): 73-8.

Ananias, M. and T. Yano (2008). "Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis." Braz J Med Biol Res **41**(10): 877-83.

Anantha, R. P., K. D. Stone, et al. (2000). "Effects of bfp mutations on biogenesis of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili." J Bacteriol **182**(9): 2498-506.

Annamalai, R., B. Jin, et al. (2004). "Recognition of ferric catecholates by FepA." J Bacteriol **186**(11): 3578-89.

Antao, E. M., L. H. Wieler, et al. (2009). "Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Gut Pathog **1**(1): 22.

- Aranda, K. R., U. Fagundes-Neto, et al. (2004). "Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella spp." J Clin Microbiol **42**(12): 5849-53.
- Arthur, M., C. E. Johnson, et al. (1989). "Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **57**(2): 303-13.
- Baaden, M. and M. S. Sansom (2004). "OmpT: molecular dynamics simulations of an outer membrane enzyme." Biophys J **87**(5): 2942-53.
- Bacheller, C. D. and J. M. Bernstein (1997). "Urinary tract infections." Med Clin North Am **81**(3): 719-30.
- Backstrom, L., A. C. Morkoc, et al. (1984). "Clinical study of mastitis-metritis-agalactia in sows in Illinois." J Am Vet Med Assoc **185**(1): 70-3.
- Badea, L., S. A. Beatson, et al. (2009). "Secretion of flagellin by the LEE-encoded type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*." BMC Microbiol **9**: 30.
- Baldini, M. M., J. B. Kaper, et al. (1983). "Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*." J Pediatr Gastroenterol Nutr **2**(3): 534-8.
- Baljer, G. and L. H. Wieler (1999). "[Animals as a source of infections for humans--diseases caused by EHEC]." Dtsch Tierarztl Wochenschr **106**(8): 339-43.
- Barman, N. N., R. Deb, et al. (2008). "Molecular characterization of shiga like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from pigs oedema." Indian J Med Res **127**(6): 602-6.
- Barth, S., A. Tscholshiew, et al. (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**(7-8): 307-16.
- Bellinzoni, R. C., J. Blackhall, et al. (1990). "Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina." Rev Argent Microbiol **22**(3): 130-6.
- Bentancor, A. (2006). "[Epidemiological role of pets in urban transmission cycle of STEC]." Medicina (B Aires) **66 Suppl 3**: 37-41.
- Bentancor, A., M. V. Rumi, et al. (2007). "Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina." FEMS Microbiol Lett **267**(2): 251-6.
- Bertin, Y., C. Martin, et al. (1998). "Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea." FEMS Microbiol Lett **162**(2): 235-9.
- Bertschinger, H. U., J. Pohlenz, et al. (1977). "[Studies on the mastitis-metritis-agalactia syndrome (milk fever) in sows. II. Bacteriological findings in spontaneous cases]." Schweiz Arch Tierheilkd **119**(6): 223-33.
- Beutin, L. (1999). "*Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats." Vet Res **30**(2-3): 285-98.
- Beutin, L., D. Geier, et al. (1993). "Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals." J Clin Microbiol **31**(9): 2483-8.

- Beutin, L., M. A. Montenegro, et al. (1989). "Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*." J Clin Microbiol **27**(11): 2559-64.
- Bhakdi, S., M. Muhly, et al. (1990). "Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release." J Clin Invest **85**(6): 1746-53.
- Bidet, P., F. Mahjoub-Messai, et al. (2007). "Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis." J Infect Dis **196**(2): 297-303.
- Bieber, D., S. W. Ramer, et al. (1998). "Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*." Science **280**(5372): 2114-8.
- Blanco, J., M. Blanco, et al. (1991). "Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals." Microbiologia **7**(2): 57-73.
- Blanco, J. E., M. Blanco, et al. (1995). "[Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* in food and clinical samples. Role of animals as reservoirs of strains pathogenic for humans]." Microbiologia **11**(1): 97-110.
- Blanco, M., J. Blanco, et al. (1993). "Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain." Am J Vet Res **54**(9): 1446-51.
- Blanco, M., J. E. Blanco, et al. (1996). "Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria." Eur J Epidemiol **12**(2): 191-8.
- Blanco, M., L. Lazo, et al. (2006). "Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea." Int Microbiol **9**(1): 53-60.
- Blanco, M., S. Schumacher, et al. (2005). "Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-eta2*)." BMC Microbiol **5**: 23.
- Blum, G., V. Falbo, et al. (1995). "Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96." FEMS Microbiol Lett **126**(2): 189-95.
- Boehm, D. F., R. A. Welch, et al. (1990). "Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes." Infect Immun **58**(6): 1951-8.
- Bonacorsi, S. and E. Bingen (2005). "Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis." Int J Med Microbiol **295**(6-7): 373-81.
- Boquet, P. (2001). "The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*." Toxicon **39**(11): 1673-80.
- Bouzari, S., A. Jafari, et al. (2007). "Distribution of genes encoding toxins and antibiotic resistance patterns in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates in Tehran." East Mediterr Health J **13**(2): 287-93.
- Braun, U., K. Nuss, et al. (2008). "Clinical and ultrasonographic findings, diagnosis and treatment of pyelonephritis in 17 cows." Vet J **175**(2): 240-8.

- Brooks, H. J., F. O'Grady, et al. (1980). "Uropathogenic properties of *Escherichia coli* in recurrent urinary-tract infection." J Med Microbiol **13**(1): 57-68.
- Brunder, W., H. Schmidt, et al. (1997). "EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V." Mol Microbiol **24**(4): 767-78.
- Calderwood, S. B. and J. J. Mekalanos (1987). "Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus." J Bacteriol **169**(10): 4759-64.
- Canil, C., I. Rosenshine, et al. (1993). "Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers." Infect Immun **61**(7): 2755-62.
- Caprioli, A., V. Falbo, et al. (1987). "Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections." J Clin Microbiol **25**(1): 146-9.
- Caprioli, A., S. Morabito, et al. (2005). "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission." Vet Res **36**(3): 289-311.
- Carbonetti, N. H., S. Boonchai, et al. (1986). "Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections." Infect Immun **51**(3): 966-8.
- Carbonetti, N. H. and P. H. Williams (1984). "A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30." Infect Immun **46**(1): 7-12.
- Carnoy, C. and S. L. Moseley (1997). "Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of *Escherichia coli* adhesins." Mol Microbiol **23**(2): 365-79.
- Carr, J. and J. R. Walton (1993). "Bacterial flora of the urinary tract of pigs associated with cystitis and pyelonephritis." Vet Rec **132**(23): 575-7.
- Carvalho, V. M., K. Irino, et al. (2007). "Random amplification of polymorphic DNA reveals clonal relationships among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from non-human primates and humans." Braz J Med Biol Res **40**(2): 237-41.
- Casey, T. A. and B. T. Bosworth (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**(1): 25-30.
- Casey, T. A., C. J. Herring, et al. (1998). "Expression of heat-stable enterotoxin STb by adherent *Escherichia coli* is not sufficient to cause severe diarrhea in neonatal pigs." Infect Immun **66**(3): 1270-2.
- Cassels, F. J. and M. K. Wolf (1995). "Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors." J Ind Microbiol **15**(3): 214-26.
- Celli, J., W. Deng, et al. (2000). "Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside." Cell Microbiol **2**(1): 1-9.
- Chagnon, M., S. D'Allaire, et al. (1991). "A prospective study of sow mortality in breeding herds." Can J Vet Res **55**(2): 180-4.
- Chao, K. L. and L. A. Dreyfus (1997). "Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells." Infect Immun **65**(8): 3209-17.

- Chapman, T. A., X. Y. Wu, et al. (2006). "Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine." Appl Environ Microbiol **72**(7): 4782-95.
- Chen, H. D. and G. Frankel (2005). "Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis." FEMS Microbiol Rev **29**(1): 83-98.
- Chen, X., L. Zhao, et al. (2008). "[Virulence genes of pathogenic *Escherichia coli* from ill pigs in china and their relationship with O-serogroups]." Wei Sheng Wu Xue Bao **48**(7): 857-62.
- Chen, Y. M., P. J. Wright, et al. (2003). "Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches." Vet Microbiol **94**(1): 57-69.
- Cheng, D. R., H. C. Sun, et al. (2006). "[Prevalence of LEE and HPI pathogenicity islands of *Escherichia coli* isolates from weaned piglets in China]." Wei Sheng Wu Xue Bao **46**(3): 368-72.
- Cherifi, A., M. Contrepolis, et al. (1994). "Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O78 isolates from human and animal infections." J Clin Microbiol **32**(5): 1197-202.
- China, B., V. Pirson, et al. (1998). "Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium." Vet Microbiol **63**(2-4): 249-59.
- Choi, C., W. Cho, et al. (2001). "Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease." Vet Microbiol **81**(1): 65-71.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, et al. (2003). "Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen." Clin Microbiol Rev **16**(3): 365-78.
- Cleary, J., L. C. Lai, et al. (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin." Microbiology **150**(Pt 3): 527-38.
- Cobeljic, M., B. Dimic, et al. (2005). "The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia." Epidemiol Infect **133**(2): 359-66.
- Coia, J. E. (1998). "Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection." FEMS Immunol Med Microbiol **20**(1): 1-9.
- Collington, G. K., I. W. Booth, et al. (1998). "Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection." Gut **42**(2): 200-7.
- Connell, I., W. Agace, et al. (1996). "Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9827-32.
- Cookson, A. L., J. Bennett, et al. (2007). "Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (*ehxA*) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*." Appl Environ Microbiol **73**(20): 6360-9.
- Cornelissen, C. N. and P. F. Sparling (1994). "Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens." Mol Microbiol **14**(5): 843-50.
- Cornick, N. A. and A. F. Helgerson (2004). "Transmission and infectious dose of *Escherichia coli* O157:H7 in swine." Appl Environ Microbiol **70**(9): 5331-5.

- Cornick, N. A., I. Matisse, et al. (1999). "Edema disease as a model for systemic disease induced by Shiga toxin-producing *E. coli*." Adv Exp Med Biol **473**: 155-61.
- Cravioto, A., S. M. Scotland, et al. (1982). "Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans." Infect Immun **36**(1): 189-97.
- Cray, W. C., Jr. and H. W. Moon (1995). "Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7." Appl Environ Microbiol **61**(4): 1586-90.
- Crepin, V. F., E. Martinez, et al. (2008). "Structural and functional properties of chimeric EspA-FliC_i filaments of EPEC." J Mol Biol **378**(1): 243-50.
- Daniell, S. J., N. Takahashi, et al. (2001). "The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*." Cell Microbiol **3**(12): 865-71.
- Daniels, G. L., H. Tohyama, et al. (1982). "A possible null phenotype in the Cromer blood group complex." Transfusion **22**(5): 362-3.
- de Brito, B. G., D. S. Leite, et al. (1999). "Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs." Vet Microbiol **65**(2): 123-32.
- de Lorenzo, V. and J. B. Neilands (1986). "Characterization of *iucA* and *iucC* genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*." J Bacteriol **167**(1): 350-5.
- De Rycke, J., A. Milon, et al. (1999). "Necrotic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens." Vet Res **30**(2-3): 221-33.
- Dean, P., M. Maresca, et al. (2005). "EPEC's weapons of mass subversion." Curr Opin Microbiol **8**(1): 28-34.
- DeRoy, C. and C. W. Maddox (2001). "Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance." Anim Health Res Rev **2**(2): 129-40.
- Dee, S. A. (1992). "Porcine urogenital disease." Vet Clin North Am Food Anim Pract **8**(3): 641-60.
- DeGrandis, S., H. Law, et al. (1989). "Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin." J Biol Chem **264**(21): 12520-5.
- Denden, I., K. Mahdouani, et al. (2004). "[Prevalence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* producing cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1) in the center of Tunisia]." Ann Biol Clin (Paris) **62**(3): 311-7.
- Dezfulian, H., I. Batisson, et al. (2003). "Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs." J Clin Microbiol **41**(4): 1375-85.
- Dhaliwal, G. K., C. Wray, et al. (1998). "Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra)." Vet Rec **143**(24): 659-61.
- Dixit, S. M., D. M. Gordon, et al. (2004). "Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* - associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract." Microbiology **150**(Pt 6): 1735-40.

- Dobrindt, U., G. Blum-Oehler, et al. (2002). "Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536." Infect Immun **70**(11): 6365-72.
- Donnenberg, M. S., J. A. Giron, et al. (1992). "A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence." Mol Microbiol **6**(22): 3427-37.
- Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper (1991). "Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector." Infect Immun **59**(12): 4310-7.
- Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper (1992). "Enteropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **60**(10): 3953-61.
- Donnenberg, M. S. and T. S. Whittam (2001). "Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." J Clin Invest **107**(5): 539-48.
- Dowling, K. J., J. A. Roberts, et al. (1987). "P-fimbriated *Escherichia coli* urinary tract infection: a clinical correlation." South Med J **80**(12): 1533-6.
- Dozois, C. M., S. Clement, et al. (1997). "Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs." FEMS Microbiol Lett **152**(2): 307-12.
- Dreyfus, L. A., B. Harville, et al. (1993). "Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB)." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3202-6.
- Duguid, J. P., S. Clegg, et al. (1979). "The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*." J Med Microbiol **12**(2): 213-27.
- DuPont, H. L., S. B. Formal, et al. (1971). "Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea." N Engl J Med **285**(1): 1-9.
- Durmaz, R., B. Otlu, et al. (2009). "The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp." Jpn J Infect Dis **62**(5): 372-7.
- Eden, C. S. and H. A. Hansson (1978). "*Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells." Infect Immun **21**(1): 229-37.
- Eichhorn, W., P. A. Bachmann, et al. (1983). "Vaccination of cows with a combined rotavirus/enterotoxigenic "*E. coli*" K99 vaccine to protect newborn calves against diarrhoea." Dev Biol Stand **53**: 237-43.
- Elliott, S. J., E. O. Krejany, et al. (2001). "EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*." Infect Immun **69**(6): 4027-33.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, et al. (2000). "The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*." Infect Immun **68**(11): 6115-26.
- Endo, Y., K. Tsurugi, et al. (1988). "Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins." Eur J Biochem **171**(1-2): 45-50.

- Escobar-Paramo, P., O. Clermont, et al. (2004). "A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*." Mol Biol Evol **21**(6): 1085-94.
- Ewers, C., M. Grobbel, et al. "Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals." J Antimicrob Chemother **65**(4): 651-60.
- Ewers, C., G. Li, et al. (2007). "Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?" Int J Med Microbiol **297**(3): 163-76.
- Fairbrother, J. M. and E. Nadeau (2006). "*Escherichia coli*: on-farm contamination of animals." Rev Sci Tech **25**(2): 555-69.
- Fairbrother, J. M., E. Nadeau, et al. (2005). "*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies." Anim Health Res Rev **6**(1): 17-39.
- Falbo, V., M. Famiglietti, et al. (1992). "Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections." Infect Immun **60**(6): 2182-7.
- Falkowski, W., M. Edwards, et al. (1986). "Inhibitory effect of substituted aromatic hydrocarbons on adherence of *Escherichia coli* to human epithelial cells." Infect Immun **52**(3): 863-6.
- Faro, S. and D. E. Fenner (1998). "Urinary tract infections." Clin Obstet Gynecol **41**(3): 744-54.
- Felmlee, T., S. Pellett, et al. (1985). "Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin." J Bacteriol **163**(1): 94-105.
- Feria, C., J. Machado, et al. (2001). "Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*." Vet Microbiol **82**(1): 81-9.
- Field, M., L. H. Graf, Jr., et al. (1978). "Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(6): 2800-4.
- Flores-Abuxapqui, J. J., G. J. Suarez-Itoil, et al. (1994). "Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life." Arch Med Res **25**(3): 303-6.
- Foley, S. L., A. M. Lynne, et al. (2009). "Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens." Infect Genet Evol **9**(4): 430-40.
- Franck, S. M., B. T. Bosworth, et al. (1998). "Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves." J Clin Microbiol **36**(6): 1795-7.
- Franz, S., P. Winter, et al. (2004). "Cystoscopy in cattle--a valuable additional tool for clinical examination." Acta Vet Hung **52**(4): 423-38.
- Fratamico, P. M., L. K. Bagi, et al. (2004). "Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study." Appl Environ Microbiol **70**(12): 7173-8.

- Freundes, B., C. Wachtler, et al. (2001). "*Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation." Mol Microbiol **40**(1): 37-51.
- Frohlicher, E., G. Krause, et al. (2008). "Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep." BMC Microbiol **8**: 144.
- 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**(2): 169-82.
- Fukuta, S., J. L. Magnani, et al. (1988). "Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb." Infect Immun **56**(7): 1748-53.
- Funfstuck, R., H. Tschape, et al. (1986). "Virulence properties of *Escherichia coli* strains in patients with chronic pyelonephritis." Infection **14**(3): 145-50.
- Gaastra, W. and A. M. Svennerholm (1996). "Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)." Trends Microbiol **4**(11): 444-52.
- Gannon, V. P. and C. L. Gyles (1990). "Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease." Vet Microbiol **24**(1): 89-100.
- Garcia, E., H. E. Bergmans, et al. (1988). "Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Escherichia coli* strains and their fimbriae." Antonie Van Leeuwenhoek **54**(2): 149-63.
- Girardeau, J. P., L. Lalioui, et al. (2003). "Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the afa-8 operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections." J Clin Microbiol **41**(1): 218-26.
- Giron, J. A., O. G. Gomez-Duarte, et al. (1997). "Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4 pili--a minireview." Gene **192**(1): 39-43.
- Giron, J. A., A. G. Torres, et al. (2002). "The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells." Mol Microbiol **44**(2): 361-79.
- Goldman, R. C., K. Joiner, et al. (1984). "Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen." J Bacteriol **159**(3): 877-82.
- Goluszko, P., S. L. Moseley, et al. (1997). "Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75:K5:H-bearing Dr fimbriae: mutation in the dra region prevented tubulointerstitial nephritis." J Clin Invest **99**(7): 1662-72.
- Goosney, D. L., D. G. Knochel, et al. (1999). "Enteropathogenic *E. coli*, Salmonella, and Shigella: masters of host cell cytoskeletal exploitation." Emerg Infect Dis **5**(2): 216-23.
- Goransson, M. and B. E. Uhlin (1984). "Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *E. coli*." Embo J **3**(12): 2885-8.
- Griffin, P. M. and R. V. Tauxe (1991). "The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome." Epidemiol Rev **13**: 60-98.

- Grimminger, F., F. Rose, et al. (1997). "Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin." J Immunol **159**(4): 1909-16.
- Grimminger, F., C. Scholz, et al. (1991). "Subhemolytic doses of *Escherichia coli* hemolysin evoke large quantities of lipoxygenase products in human neutrophils." J Biol Chem **266**(22): 14262-9.
- Grobbel, M., A. Lubke-Becker, et al. (2007). "Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **120**(9-10): 391-401.
- Guignot, J., C. Chaplais, et al. (2007). "The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells." Cell Microbiol **9**(1): 204-21.
- Guyer, D. M., I. R. Henderson, et al. (2000). "Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **38**(1): 53-66.
- Guyer, D. M., J. S. Kao, et al. (1998). "Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and Catheter-associated bacteriuria and from fecal samples." Infect Immun **66**(9): 4411-7.
- Guyer, D. M., S. Radulovic, et al. (2002). "Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells." Infect Immun **70**(8): 4539-46.
- Gyles, C. L. (2007). "Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview." J Anim Sci **85**(13 Suppl): E45-62.
- Hacker, J. (1992). "Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections." Can J Microbiol **38**(7): 720-7.
- Hacker, J., H. Kestler, et al. (1993). "Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate." Infect Immun **61**(2): 544-50.
- Hagberg, L., U. Jodal, et al. (1981). "Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections." Infect Immun **31**(2): 564-70.
- Hammermueller, J., S. Kruth, et al. (1995). "Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea." Can J Vet Res **59**(4): 265-70.
- Hancock, V., L. Ferrieres, et al. (2008). "The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine." Microbiology **154**(Pt 1): 167-75.
- Handl, C. E., E. Olsson, et al. (1992). "Evaluation of three different STb assays and comparison of enterotoxin pattern over a five-year period in Swedish porcine *Escherichia coli*." Diagn Microbiol Infect Dis **15**(6): 505-10.
- Hanson, M. S. and C. C. Brinton, Jr. (1988). "Identification and characterization of *E. coli* type-1 pilus tip adhesion protein." Nature **332**(6161): 265-8.
- Harber, M. J., N. Topley, et al. (1986). "Virulence factors of urinary pathogens." Clin Sci (Lond) **70**(6): 531-8.

- Harel, J., F. Daigle, et al. (1991). "Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals." FEMS Microbiol Lett **66**(2): 177-82.
- Harel, J., J. Fairbrother, et al. (1993). "Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves." Vet Microbiol **38**(1-2): 139-55.
- Hartland, E. L., M. Batchelor, et al. (1999). "Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells." Mol Microbiol **32**(1): 151-8.
- Herenda, D., T. W. Dukes, et al. (1990). "An abattoir survey of urinary bladder lesions in cattle." Can Vet J **31**(7): 515-518.
- Herlax, V. and L. Bakas (2003). "Acyl chains are responsible for the irreversibility in the *Escherichia coli* alpha-hemolysin binding to membranes." Chem Phys Lipids **122**(1-2): 185-90.
- Hermansson, I., S. Einarsson, et al. (1978). "On the agalactia post partum in the sow. A clinical study." Nord Vet Med **30**(11): 465-73.
- Hicks, S., G. Frankel, et al. (1998). "Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro." Infect Immun **66**(4): 1570-8.
- Hien, B. T., F. Scheutz, et al. (2008). "Diarrheagenic *Escherichia coli* and Shigella strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam." J Clin Microbiol **46**(3): 996-1004.
- Hirsch, A. C., H. Philipp, et al. (2003). "Investigation on the efficacy of meloxicam in sows with mastitis-metritis-agalactia syndrome." J Vet Pharmacol Ther **26**(5): 355-60.
- Hoque, S. S., A. S. Faruque, et al. (1994). "Infectious agents causing acute watery diarrhoea in infants and young children in Bangladesh and their public health implications." J Trop Pediatr **40**(6): 351-4.
- Horne, S. M., J. L. Goplin, et al. (2004). "Cloning and sequencing of *cnf1* from *Escherichia coli* incriminated in mink and bovine colibacillosis." Vet Res Commun **28**(2): 103-12.
- Houdouin, V., S. Bonacorsi, et al. (2007). "Phylogenetic groups and virulence factors of *Escherichia coli* strains causing pyelonephritis in children with and without urinary tract abnormalities." Clin Microbiol Infect **13**(7): 740-2.
- Hussein, H. S. (2007). "Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products." J Anim Sci **85**(13 Suppl): E63-72.
- Ibarz Pavon, A. B. and M. C. Maiden (2009). "Multilocus sequence typing." Methods Mol Biol **551**: 129-40.
- Ishii, S., K. P. Meyer, et al. (2007). "Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources." Appl Environ Microbiol **73**(18): 5703-10.
- Island, M. D., X. Cui, et al. (1998). "Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells." Infect Immun **66**(7): 3384-9.

- Jacewicz, M. S., M. Mobassaleh, et al. (1994). "Pathogenesis of Shigella diarrhea: XVII. A mammalian cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to Shiga toxin." J Infect Dis **169**(3): 538-46.
- Jann, K. and B. Jann (1992). "Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance." Can J Microbiol **38**(7): 705-10.
- Japoni, A., M. Gudarzi, et al. (2008). "Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in Southern Iran." Jpn J Infect Dis **61**(1): 85-8.
- Jelcic, I., E. Hufner, et al. (2008). "Repression of the locus of the enterocyte effacement-encoded regulator of gene transcription of *Escherichia coli* O157:H7 by *Lactobacillus reuteri* culture supernatants is LuxS and strain dependent." Appl Environ Microbiol **74**(10): 3310-4.
- Jerse, A. E. and J. B. Kaper (1991). "The eae gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid." Infect Immun **59**(12): 4302-9.
- Johanson, I. M., K. Plos, et al. (1993). "Pap, papG and prsG DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract." Microb Pathog **15**(2): 121-9.
- Johnsen, G., Y. Wasteson, et al. (2001). "*Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999." Int J Food Microbiol **65**(3): 193-200.
- Johnson, D. E., C. Drachenberg, et al. (2000). "The role of cytotoxic necrotizing factor-1 in colonization and tissue injury in a murine model of urinary tract infection." FEMS Immunol Med Microbiol **28**(1): 37-41.
- Johnson, J. R. (1991). "Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection." Clin Microbiol Rev **4**(1): 80-128.
- Johnson, J. R. and J. J. Brown (1996). "A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal(alpha 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*." J Infect Dis **173**(4): 920-6.
- Johnson, J. R., C. Clabots, et al. (2008). "Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members." J Clin Microbiol **46**(12): 4078-82.
- Johnson, J. R., N. Kaster, et al. (2003). "Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection." J Clin Microbiol **41**(1): 337-45.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, et al. (2005). "Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis." J Infect Dis **191**(1): 46-50.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, et al. (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**(5): 759-68.
- Johnson, J. R., S. L. Moseley, et al. (1988). "Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics." Infect Immun **56**(2): 405-12.

- Johnson, J. R., T. T. O'Bryan, et al. (2000). "Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III." Infect Immun **68**(6): 3327-36.
- Johnson, J. R. and T. A. Russo (2002). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". J Lab Clin Med **139**(3): 155-62.
- Johnson, J. R. and T. A. Russo (2002). "Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections." J Infect Dis **186**(6): 859-64.
- Johnson, J. R., F. Scheutz, et al. (2005). "Phylogenetic and pathotypic comparison of concurrent urine and rectal *Escherichia coli* isolates from men with febrile urinary tract infection." J Clin Microbiol **43**(8): 3895-900.
- Johnson, J. R. and A. L. Stell (2000). "Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise." J Infect Dis **181**(1): 261-72.
- Johnson, J. R., A. L. Stell, et al. (2000). "Analysis of the F antigen-specific papA alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay." Infect Immun **68**(3): 1587-99.
- Johnson, S. and C. M. Taylor (2008). "What's new in haemolytic uraemic syndrome?" Eur J Pediatr **167**(9): 965-71.
- Johnson, T. J., Y. M. Wannemuehler, et al. (2008). "Evolution of the iss gene in *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **74**(8): 2360-9.
- Kaipainen, T., T. Pohjanvirta, et al. (2002). "Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis." Vet Microbiol **85**(1): 37-46.
- Kallenius, G., R. Mollby, et al. (1981). "Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections." Lancet **2**(8260-61): 1369-72.
- Kallenius, G., R. Mollby, et al. (1980). "In vitro adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to human periurethral cells." Infect Immun **28**(3): 972-80.
- Kallenius, G., S. B. Svenson, et al. (1982). "Carbohydrate receptor structures recognized by uropathogenic *E. coli*." Scand J Infect Dis Suppl **33**: 52-60.
- Kanukollu, U., S. Bieler, et al. (1985). "Contribution of the *traT* gene to serum resistance among clinical isolates of enterobacteriaceae." J Med Microbiol **19**(1): 61-7.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, et al. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-40.
- Karch, H., A. Mellmann, et al. (2009). "Epidemiology and pathogenesis of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **122**(11-12): 417-24.
- Karg, H. and G. Bilkei (2002). "Causes of sow mortality in Hungarian indoor and outdoor pig production units." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **115**(9-10): 366-8.
- Karmali, M. A. (1989). "Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **2**(1): 15-38.
- Karmali, M. A. (2004). "Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview." Mol Biotechnol **26**(2): 117-22.

- Kawamori, F., M. Hiroi, et al. (2008). "Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157 : H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE." J Med Microbiol **57**(Pt 1): 58-63.
- Kenny, B. and B. B. Finlay (1995). "Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7991-5.
- Kerenyi, M., H. E. Allison, et al. (2005). "Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains." J Clin Microbiol **43**(6): 2965-8.
- Khan, A. S., B. Kniep, et al. (2000). "Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **68**(6): 3541-7.
- Khursigara, C., M. Abul-Milh, et al. (2001). "Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine." Infect Immun **69**(11): 6573-9.
- Kim, B. Y., J. Kang, et al. (2005). "Invasion processes of pathogenic *Escherichia coli*." Int J Med Microbiol **295**(6-7): 463-70.
- Klemm, P. and G. Christiansen (1987). "Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae." Mol Gen Genet **208**(3): 439-45.
- Knutton, S., I. Rosenshine, et al. (1998). "A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells." Embo J **17**(8): 2166-76.
- Koh, S. Y., S. George, et al. (2008). "Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*." Vet Microbiol **130**(1-2): 191-7.
- Konopka, K. and J. B. Neilands (1984). "Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron." Biochemistry **23**(10): 2122-7.
- Korhonen, T. K., J. Parkkinen, et al. (1986). "Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to human kidney epithelium." Infect Immun **54**(2): 322-7.
- Korhonen, T. K., V. Vaisanen, et al. (1982). "P-antigen-recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains." Infect Immun **37**(1): 286-91.
- Korhonen, T. K., R. Virkola, et al. (1990). "Tissue tropism of *Escherichia coli* adhesins in human extraintestinal infections." Curr Top Microbiol Immunol **151**: 115-27.
- Korudziiski, N., G. Bozhkova, et al. (1987). "[Drug resistance of bacterial strains isolated from sows with the clinical picture of mastitis-metritis-agalactia]." Vet Med Nauki **24**(7): 15-9.
- Korudziiski, N., G. Bozhkova, et al. (1987). "[Microbial etiology of the MMA syndrome (mastitis-metritis-agalactia) in swine raised commercially]." Vet Med Nauki **24**(5): 11-5.
- Krag, L., V. Hancock, et al. (2008). "Genotypic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis." Vet Microbiol.
- Krause, G., S. Zimmermann, et al. (2005). "Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types." Vet Microbiol **106**(1-2): 87-95.

- Krogh, H. V. (1983). "Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal diarrhoea." Nord Vet Med **35**(10): 346-52.
- Kucheria, R., P. Dasgupta, et al. (2005). "Urinary tract infections: new insights into a common problem." Postgrad Med J **81**(952): 83-6.
- Kuhar, I., M. Grabnar, et al. (1998). "Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals." FEMS Microbiol Lett **164**(2): 243-8.
- Lalioui, L., M. Jouve, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves." Infect Immun **67**(10): 5048-59.
- Langermann, S., R. Mollby, et al. (2000). "Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*." J Infect Dis **181**(2): 774-8.
- Langermann, S., S. Palaszynski, et al. (1997). "Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination." Science **276**(5312): 607-11.
- Latham, R. H. and W. E. Stamm (1984). "Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies." J Infect Dis **149**(6): 835-40.
- Lau, S. H., S. Reddy, et al. (2008). "Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **46**(3): 1076-80.
- Law, D. and J. Kelly (1995). "Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups." Infect Immun **63**(2): 700-2.
- Le Bouguenec, C. and Y. Bertin (1999). "AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals." Vet Res **30**(2-3): 317-42.
- Le Gall, T., O. Clermont, et al. (2007). "Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains." Mol Biol Evol **24**(11): 2373-84.
- Lee, C. H., S. T. Hu, et al. (1985). "Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene." J Bacteriol **162**(2): 615-20.
- Lee, S. I., S. G. Kang, et al. (2008). "Development of multiplex polymerase chain reaction assays for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* and their application to field isolates from piglets with diarrhea." J Vet Diagn Invest **20**(4): 492-6.
- Lees, G. E. and K. S. Rogers (1986). "Treatment of urinary tract infections in dogs and cats." J Am Vet Med Assoc **189**(6): 648-52.
- Leffler, H. and C. Svanborg-Eden (1981). "Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells." Infect Immun **34**(3): 920-9.
- Lencer, W. I., C. Constable, et al. (1995). "Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL." J Cell Biol **131**(4): 951-62.

- Leomil, L., L. Aidar-Ugrinovich, et al. (2003). "Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil." Vet Microbiol **97**(1-2): 103-9.
- Levine, M. M. (1987). "*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent." J Infect Dis **155**(3): 377-89.
- Levine, M. M., C. Ferreccio, et al. (1993). "Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile." Am J Epidemiol **138**(10): 849-69.
- Leying, H., S. Suerbaum, et al. (1990). "The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*." Infect Immun **58**(1): 222-7.
- Li, D., B. Liu, et al. "A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections." J Microbiol Methods **82**(1): 71-7.
- Li, Z. J., H. Q. Li, et al. (2008). "[Methods for the identification of horizontal gene transfer (HGT) events and progress in related fields]." Yi Chuan **30**(9): 1108-14.
- Liebhold, M., M. Wendt, et al. (1995). "Clinical, and light and electron microscopical findings in sows with cystitis." Vet Rec **137**(6): 141-4.
- Lim, K. T., R. Yasin, et al. (2009). "Characterization of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from hospitals in Malaysia." J Biomed Biotechnol **2009**: 165637.
- Ling, G. V., C. R. Norris, et al. (2001). "Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995)." J Vet Intern Med **15**(4): 341-7.
- Low, D. A., B. A. Braaten, et al. (1988). "Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections." Infect Immun **56**(10): 2601-9.
- Lynne, A. M., J. A. Skyberg, et al. (2007). "Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*." J Appl Microbiol **102**(3): 660-6.
- Maiden, M. C. (2006). "Multilocus sequence typing of bacteria." Annu Rev Microbiol **60**: 561-88.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, et al. (1998). "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3140-5.
- Mainil, J. G., E. Jacquemin, et al. (1997). "Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family." Can J Vet Res **61**(3): 193-9.
- Maiti, S. N., J. Harel, et al. (1993). "Structure and copy number analyses of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related gene clusters in F165-positive bovine and porcine *Escherichia coli* isolates." Infect Immun **61**(6): 2453-61.
- Mangia, A. H., A. N. Duarte, et al. (1993). "Aetiology of acute diarrhoea in hospitalized children in Rio de Janeiro City, Brazil." J Trop Pediatr **39**(6): 365-7.

- Marcus, D. M., S. K. Kundu, et al. (1981). "The P blood group system: recent progress in immunochemistry and genetics." Semin Hematol **18**(1): 63-71.
- Marklund, B. I., J. M. Tennent, et al. (1992). "Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* *pap* and *prs* pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties." Mol Microbiol **6**(16): 2225-42.
- Markusfeld, O., N. Nahari, et al. (1989). "Observations on bovine pyelonephritis." Br Vet J **145**(6): 573-9.
- Martins, M. F., N. M. Martinez-Rossi, et al. (2000). "Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil." Vet Microbiol **76**(1): 51-9.
- May, A. K., T. G. Gleason, et al. (2000). "Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis." Infect Immun **68**(1): 176-83.
- McCarter, J. D., D. Stephens, et al. (2004). "Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT." J Bacteriol **186**(17): 5919-25.
- McDaniel, T. K. and J. B. Kaper (1997). "A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12." Mol Microbiol **23**(2): 399-407.
- McNamara, B. P., A. Koutsouris, et al. (2001). "Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function." J Clin Invest **107**(5): 621-9.
- Mead, P. S. and P. M. Griffin (1998). "*Escherichia coli* O157:H7." Lancet **352**(9135): 1207-12.
- Mead, P. S., L. Slutsker, et al. (1999). "Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg." Emerg Infect Dis **5**(6): 841-2.
- Mekalanos, J. J., R. J. Collier, et al. (1979). "Enzymic activity of cholera toxin. II. Relationships to proteolytic processing, disulfide bond reduction, and subunit composition." J Biol Chem **254**(13): 5855-61.
- Mellies, J. L., A. M. Barron, et al. (2007). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation." Infect Immun **75**(9): 4199-210.
- Mellies, J. L., S. J. Elliott, et al. (1999). "The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)." Mol Microbiol **33**(2): 296-306.
- Mills, M., K. C. Meysick, et al. (2000). "Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism." Infect Immun **68**(10): 5869-80.
- Mitsumori, K., A. Terai, et al. (1999). "Virulence characteristics of *Escherichia coli* in acute bacterial prostatitis." J Infect Dis **180**(4): 1378-81.
- Mobley, H. L., D. M. Green, et al. (1990). "Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains." Infect Immun **58**(5): 1281-9.

- Moon, H. W., L. J. Hoffman, et al. (1999). "Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa." J Vet Diagn Invest **11**(6): 557-60.
- Moon, H. W., R. A. Schneider, et al. (1986). "Comparative prevalence of four enterotoxin genes among *Escherichia coli* isolated from swine." Am J Vet Res **47**(2): 210-2.
- Moore, J. E., M. Watabe, et al. (2008). "Molecular characterisation of verocytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing." Br J Biomed Sci **65**(3): 161-3.
- Mora, A., C. Lopez, et al. (2009). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution." BMC Microbiol **9**: 132.
- Moreno, E., A. Andreu, et al. (2008). "Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host." J Clin Microbiol **46**(8): 2529-34.
- Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, et al. (2007). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns." J Clin Microbiol **45**(10): 3366-76.
- Moxley, R. A. (2000). "Edema disease." Vet Clin North Am Food Anim Pract **16**(1): 175-85.
- Moxley, R. A. and D. H. Francis (1986). "Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves." Infect Immun **53**(2): 339-46.
- Muller, D., I. Benz, et al. (2009). "Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions." Infect Immun **77**(8): 3501-13.
- Mulvey, M. A., Y. S. Lopez-Boado, et al. (1998). "Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*." Science **282**(5393): 1494-7.
- Muniesa, M., M. de Simon, et al. (2003). "Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak." Infect Immun **71**(8): 4554-62.
- Muniesa, M., J. Recktenwald, et al. (2000). "Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin." Infect Immun **68**(9): 4850-5.
- Nabuurs, M. J. (1991). "[Etiological and pathogenetic aspects of diarrhea in piglets following weaning]." Tijdschr Diergeneeskd **116**(23): 1175-82.
- Nagy, B. and P. Z. Fekete (1999). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals." Vet Res **30**(2-3): 259-84.
- Nagy, B. and P. Z. Fekete (2005). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine." Int J Med Microbiol **295**(6-7): 443-54.
- Nakazato, G., C. Gyles, et al. (2004). "Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC)." Vet Microbiol **101**(4): 269-77.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **11**(1): 142-201.

- Nataro, J. P., K. O. Maher, et al. (1987). "Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **55**(10): 2370-7.
- Nataro, J. P., I. C. Scaletsky, et al. (1985). "Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **48**(2): 378-83.
- Neely, M. N. and D. I. Friedman (1998). "Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release." Mol Microbiol **28**(6): 1255-67.
- Neilands, J. B. (1981). "Microbial iron compounds." Annu Rev Biochem **50**: 715-31.
- Neilands, J. B. (1992). "Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30)." Can J Microbiol **38**(7): 728-33.
- Nemoy, L. L., M. Kotetishvili, et al. (2005). "Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates." J Clin Microbiol **43**(4): 1776-81.
- Ngeleka, M. (2002). "Isolation of a new *Escherichia coli* pathotype associated with diarrhea in piglets." Can Vet J **43**(8): 623-4.
- Ngeleka, M., J. Pritchard, et al. (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**(3): 242-52.
- Nishi, J., J. Sheikh, et al. (2003). "The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system." J Biol Chem **278**(46): 45680-9.
- Noamani, B. N., J. M. Fairbrother, et al. (2003). "Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs." Vet Microbiol **97**(1-2): 87-101.
- Norris, C. R., B. J. Williams, et al. (2000). "Recurrent and persistent urinary tract infections in dogs: 383 cases (1969-1995)." J Am Anim Hosp Assoc **36**(6): 484-92.
- Nowicki, B., C. Svanborg-Eden, et al. (1989). "Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **57**(2): 446-51.
- Nowicki, B., L. Truong, et al. (1988). "Presence of the Dr receptor in normal human tissues and its possible role in the pathogenesis of ascending urinary tract infection." Am J Pathol **133**(1): 1-4.
- O'Brien, A. D. and R. K. Holmes (1987). "Shiga and Shiga-like toxins." Microbiol Rev **51**(2): 206-20.
- O'Brien, A. D., L. R. Marques, et al. (1989). "Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933." Microb Pathog **6**(5): 381-90.
- O'Hanley, P., D. Low, et al. (1985). "Gal-Gal binding and hemolysin phenotypes and genotypes associated with uropathogenic *Escherichia coli*." N Engl J Med **313**(7): 414-20.
- Ochoa, T. J., F. Barletta, et al. (2008). "New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection." Trans R Soc Trop Med Hyg **102**(9): 852-6.

- Ok, M., L. Guler, et al. (2009). "The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR." Zoonoses Public Health **56**(2): 94-101.
- Okeke, I. N., I. C. Scaletsky, et al. (2004). "Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*." J Clin Microbiol **42**(1): 36-44.
- Okoh, A. I. and A. N. Osode (2008). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): a recurring decimal in infants' and travelers' diarrhea." Rev Environ Health **23**(2): 135-48.
- Olson, P., A. Hedhammar, et al. (1985). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs with diarrhoea." Vet Microbiol **10**(6): 577-89.
- Oluoch, A. O., C. H. Kim, et al. (2001). "Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990-1998)." J Am Vet Med Assoc **218**(3): 381-4.
- Oporto, B., J. I. Esteban, et al. (2008). "*Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep and swine herds in Northern Spain." Zoonoses Public Health **55**(2): 73-81.
- Orskov, F. and I. Orskov (1992). "*Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals." Can J Microbiol **38**(7): 699-704.
- Orskov, I. and F. Orskov (1983). "Serology of *Escherichia coli* fimbriae." Prog Allergy **33**: 80-105.
- Osek, J. (2001). "Characterization of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from healthy calves in Poland." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **48**(9): 641-6.
- 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**(1): 65-72.
- Oswald, E., H. Schmidt, et al. (2000). "Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant." Infect Immun **68**(1): 64-71.
- Ott, M., J. Hacker, et al. (1986). "Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (*sfa*) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections." Infect Immun **54**(3): 646-53.
- Paiba, G. A., J. W. Wilesmith, et al. (2003). "Prevalence of faecal excretion of verocytotoxicogenic *Escherichia coli* O157 in cattle in England and Wales." Vet Rec **153**(12): 347-53.
- Parkkinen, J., J. Finne, et al. (1983). "*Escherichia coli* strains binding neuraminyl alpha 2-3 galactosides." Biochem Biophys Res Commun **111**(2): 456-61.
- Passey, S., A. Bradley, et al. (2008). "*Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway." Vet Microbiol **130**(1-2): 151-64.
- Peixoto, J. C., S. Y. Bando, et al. (2001). "Genetic differences between *Escherichia coli* O26 strains isolated in Brazil and in other countries." FEMS Microbiol Lett **196**(2): 239-44.
- Pere, A., B. Nowicki, et al. (1987). "Expression of P, type-1, and type-1C fimbriae of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute urinary tract infection." J Infect Dis **156**(4): 567-74.

- Persson, S., K. E. Olsen, et al. (2007). "A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory." Clin Microbiol Infect **13**(5): 516-24.
- Peterson, J. W. and S. C. Whipp (1995). "Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*." Infect Immun **63**(4): 1452-61.
- Picard, B., J. S. Garcia, et al. (1999). "The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection." Infect Immun **67**(2): 546-53.
- Pitondo-Silva, A., L. A. Minarini, et al. (2009). "Clonal relationships determined by multilocus sequence typing among enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Brazil." Can J Microbiol **55**(6): 672-9.
- Prada, J., G. Baljer, et al. (1991). "Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis." Vet Microbiol **29**(1): 59-73.
- Prager, R., U. Strutz, et al. (2003). "Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms." Int J Med Microbiol **292**(7-8): 477-86.
- Puente, J. L., D. Bieber, et al. (1996). "The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals." Mol Microbiol **20**(1): 87-100.
- Pupo, G. M., D. K. Karaolis, et al. (1997). "Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies." Infect Immun **65**(7): 2685-92.
- Qadri, F., A. M. Svennerholm, et al. (2005). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention." Clin Microbiol Rev **18**(3): 465-83.
- Ramboarina, S., P. J. Fernandes, et al. (2005). "Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(48): 40252-60.
- Rebhun, W. C., S. G. Dill, et al. (1989). "Pyelonephritis in cows: 15 cases (1982-1986)." J Am Vet Med Assoc **194**(7): 953-5.
- Reeves, P. (1995). "Role of O-antigen variation in the immune response." Trends Microbiol **3**(10): 381-6.
- Riegman, N., R. Kusters, et al. (1990). "F1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the foc gene cluster and identification of minor subunits." J Bacteriol **172**(2): 1114-20.
- Rippere-Lampe, K. E., A. D. O'Brien, et al. (2001). "Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun **69**(6): 3954-64.
- Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, et al. (2005). "Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis." Microbiology **151**(Pt 6): 2097-110.
- Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, et al. (2005). "Characterizing the APEC pathotype." Vet Res **36**(2): 241-56.

- Ron, E. Z. (2006). "Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens." Curr Opin Microbiol **9**(1): 28-32.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski, et al. (1996). "A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation." Embo J **15**(11): 2613-24.
- Ross, R. F., L. L. Christian, et al. (1969). "Role of certain bacteria in mastitis-metritis-agalactia of sows." J Am Vet Med Assoc **155**(12): 1844-52.
- Ross, R. F., R. L. Harmon, et al. (1983). "Susceptibility of sows to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis." Am J Vet Res **44**(6): 949-54.
- Rousset, E. and J. D. Dubreuil (1999). "Evidence that *Escherichia coli* STb enterotoxin binds to lipidic components extracted from the pig jejunal mucosa." Toxicon **37**(11): 1529-37.
- Rousset, E., J. Harel, et al. (1998). "Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved." Microb Pathog **24**(5): 277-88.
- Russo, T. A. and J. R. Johnson (2000). "Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC." J Infect Dis **181**(5): 1753-4.
- Saldana, Z., A. L. Erdem, et al. (2009). "The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*." J Bacteriol **191**(11): 3451-61.
- Samuel, J. E., L. P. Perera, et al. (1990). "Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants." Infect Immun **58**(3): 611-8.
- Sancak, A. A., H. C. Rutgers, et al. (2004). "Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea." Vet Rec **154**(4): 101-6.
- Sandhu, K. S. and C. L. Gyles (2002). "Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves." Can J Vet Res **66**(2): 65-72.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (1996). "Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin." Physiol Rev **76**(4): 949-66.
- Santo, E., C. Macedo, et al. (2006). "Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **48**(4): 185-8.
- Sanz, M. E., M. R. Vinas, et al. (1998). "Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina." Eur J Epidemiol **14**(4): 399-403.
- Savarino, S. J., A. Fasano, et al. (1991). "Enteraggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model." J Clin Invest **87**(4): 1450-5.
- Savarino, S. J., A. Fasano, et al. (1993). "Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 3093-7.
- Savarino, S. J., A. McVeigh, et al. (1996). "Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative *E. coli*." J Infect Dis **173**(4): 1019-22.

- Schaeffer, A. J., N. Rajan, et al. (2001). "Host pathogenesis in urinary tract infections." Int J Antimicrob Agents **17**(4): 245-51.
- Schierack, P., H. Steinruck, et al. (2006). "Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs." Appl Environ Microbiol **72**(10): 6680-6.
- Schierack, P., N. Walk, et al. (2008). "ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group." Environ Microbiol **10**(7): 1742-51.
- Schilling, J. D., M. A. Mulvey, et al. (2001). "Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections." J Infect Dis **183** Suppl 1: S36-40.
- Schmidt, H., L. Beutin, et al. (1995). "Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933." Infect Immun **63**(3): 1055-61.
- Schmidt, H., M. Bielaszewska, et al. (1999). "Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3855-61.
- Schmoll, T., J. Morschhauser, et al. (1990). "Complete genetic organization and functional aspects of the *Escherichia coli* S fimbrial adhesion determinant: nucleotide sequence of the genes *sfa B, C, D, E, F*." Microb Pathog **9**(5): 331-43.
- Schubert, S., A. Rakin, et al. (1998). "Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans." Infect Immun **66**(2): 480-5.
- Schultsz, C., G. J. Pool, et al. (1994). "Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR." J Clin Microbiol **32**(10): 2393-7.
- Schwarz, S., E. Alesik, et al. (2007). "The BfT-GermVet monitoring program--aims and basics." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **120**(9-10): 357-62.
- Sears, C. L. and J. B. Kaper (1996). "Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion." Microbiol Rev **60**(1): 167-215.
- Selvarangan, R., P. Goluszko, et al. (2004). "Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence." Infect Immun **72**(8): 4827-35.
- Sherwood, D., D. R. Snodgrass, et al. (1983). "Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves in Scotland and northern England." Vet Rec **113**(10): 208-12.
- Siitonen, A. (1992). "*Escherichia coli* in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity." J Infect Dis **166**(5): 1058-65.
- Sixma, T. K., K. H. Kalk, et al. (1993). "Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin." J Mol Biol **230**(3): 890-918.
- Sizemore, D. R., K. L. Roland, et al. (2004). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors and vaccine approaches." Expert Rev Vaccines **3**(5): 585-95.

- Skals, M., N. R. Jorgensen, et al. (2009). "Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 4030-5.
- Smith, J. L., P. M. Fratamico, et al. (2007). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Foodborne Pathog Dis **4**(2): 134-63.
- Smith, J. M., E. J. Feil, et al. (2000). "Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria." Bioessays **22**(12): 1115-22.
- Smith, K. A., S. Kruth, et al. (1998). "A case-control study of verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in cats with diarrhea." Can J Vet Res **62**(2): 87-92.
- So, M. and B. J. McCarthy (1980). "Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(7): 4011-5.
- Sokurenko, E. V., V. Chesnokova, et al. (1998). "Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8922-6.
- Spitz, J., R. Yuhan, et al. (1995). "Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function." Am J Physiol **268**(2 Pt 1): G374-9.
- Spratt, B. G. (1999). "Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet." Curr Opin Microbiol **2**(3): 312-6.
- Spratt, B. G. and M. C. Maiden (1999). "Bacterial population genetics, evolution and epidemiology." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1384): 701-10.
- Stamm, M. and I. Sorg (1993). "[Intestinal receptors for adhesive fimbriae of *Escherichia coli* in swine--a literature review]." Schweiz Arch Tierheilkd **135**(3): 89-95.
- Stanley, P., V. Koronakis, et al. (1998). "Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 309-33.
- Starcic, M., J. R. Johnson, et al. (2002). "Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxic strains." Vet Microbiol **85**(4): 361-77.
- Stegemann, M. R., C. A. Passmore, et al. (2006). "Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new extended- spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in Europe and North America." Antimicrob Agents Chemother **50**(7): 2286-92.
- Stone, K. D., H. Z. Zhang, et al. (1996). "A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus." Mol Microbiol **20**(2): 325-37.
- Sukumar, M., J. Rizo, et al. (1995). "The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism." Protein Sci **4**(9): 1718-29.
- Sukupolvi, S. and C. D. O'Connor (1990). "TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment." Microbiol Rev **54**(4): 331-41.
- Svennerholm, A. M., C. Wenneras, et al. (1990). "Roles of different coli surface antigens of colonization factor antigen II in colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits." Infect Immun **58**(2): 341-6.

- Svenson, S. B., H. Hultberg, et al. (1983). "P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: identification and chemical characterization of receptors." Infection **11**(1): 61-7.
- Tacket, C. O., R. H. Reid, et al. (1994). "Enteral immunization and challenge of volunteers given enterotoxigenic *E. coli* CFA/II encapsulated in biodegradable microspheres." Vaccine **12**(14): 1270-4.
- Tacket, C. O., M. B. Sztein, et al. (2000). "Role of EspB in experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection." Infect Immun **68**(6): 3689-95.
- Takahashi, A., S. Kanamaru, et al. (2006). "*Escherichia coli* isolates associated with uncomplicated and complicated cystitis and asymptomatic bacteriuria possess similar phylogenies, virulence genes, and O-serogroup profiles." J Clin Microbiol **44**(12): 4589-92.
- Tartof, S. Y., O. D. Solberg, et al. (2005). "Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **43**(12): 5860-4.
- Tauschek, M., R. A. Strugnell, et al. (2002). "Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity island of rabbit-specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **44**(6): 1533-50.
- Taylor, P. W. (1983). "Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria." Microbiol Rev **47**(1): 46-83.
- Teel, L. D., A. R. Melton-Celsa, et al. (2002). "One of two copies of the gene for the activatable shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage." Infect Immun **70**(8): 4282-91.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, et al. "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **8**(3): 207-17.
- Thomas, L. V., M. M. McConnell, et al. (1985). "The possession of three novel coli surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the putative colonization factor PCF8775." J Gen Microbiol **131**(9): 2319-26.
- Tobe, T., G. K. Schoolnik, et al. (1996). "Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **21**(5): 963-75.
- Tornieporth, N. G., J. John, et al. (1995). "Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR." J Clin Microbiol **33**(5): 1371-4.
- Toth, I., E. Oswald, et al. (2000). "Porcine postweaning diarrhea isolates of *Escherichia coli* with uropathogenic characters." Adv Exp Med Biol **485**: 331-3.
- Toth, I., E. Oswald, et al. (2000). "Characterization of intestinal *cnf1+* *Escherichia coli* from weaned pigs." Int J Med Microbiol **290**(6): 539-42.
- Trabulsi, L. R., R. Keller, et al. (2002). "Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*." Emerg Infect Dis **8**(5): 508-13.
- Tseng, C. C., J. J. Wu, et al. (2002). "Roles of host and bacterial virulence factors in the development of upper urinary tract infection caused by *Escherichia coli*." Am J Kidney Dis **39**(4): 744-52.

- Turk, J., C. Maddox, et al. (1998). "Examination for heat-labile, heat-stable, and Shiga-like toxins and for the *eaeA* gene in *Escherichia coli* isolates obtained from dogs dying with diarrhea: 122 cases (1992-1996)." J Am Vet Med Assoc **212**(11): 1735-6.
- Turner, S. M., R. R. Chaudhuri, et al. (2006). "Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages." J Clin Microbiol **44**(12): 4528-36.
- Uber, A. P., L. R. Trabulsi, et al. (2006). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes." FEMS Microbiol Lett **256**(2): 251-7.
- Urwin, R. and M. C. Maiden (2003). "Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology." Trends Microbiol **11**(10): 479-87.
- Usein, C. R., M. Damian, et al. (2001). "Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases." J Cell Mol Med **5**(3): 303-10.
- Vagarali, M. A., S. G. Karadesai, et al. (2008). "Haemagglutination and siderophore production as the urovirulence markers of uropathogenic *Escherichia coli*." Indian J Med Microbiol **26**(1): 68-70.
- van de Kar, N. C., H. G. Roelofs, et al. (1996). "Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in hemolytic uremic syndrome in part of western Europe." Eur J Pediatr **155**(7): 592-5.
- Van den Broeck, W., E. Cox, et al. (2000). "The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors." Vet Microbiol **71**(3-4): 223-44.
- van Die, I., B. van Geffen, et al. (1985). "Type 1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: cloning and characterization of the genes involved in the expression of the 1C antigen and nucleotide sequence of the subunit gene." Gene **34**(2-3): 187-96.
- Van Loy, C. P., E. V. Sokurenko, et al. (2002). "The major structural subunits of Dr and F1845 fimbriae are adhesins." Infect Immun **70**(4): 1694-702.
- Vandeputte-Rutten, L., R. A. Kramer, et al. (2001). "Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site." Embo J **20**(18): 5033-9.
- Verweyen, H. M., H. Karch, et al. (2000). "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes." Pediatr Nephrol **14**(1): 73-83.
- Virkola, R., B. Westerlund, et al. (1988). "Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder." Infect Immun **56**(10): 2615-22.
- Vu-Khac, H., E. Holoda, et al. (2007). "Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia." Vet J **174**(1): 176-87.
- Vuopio-Varkila, J. and G. K. Schoolnik (1991). "Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins." J Exp Med **174**(5): 1167-77.
- Wagner, W., M. Vogel, et al. (1983). "Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions." J Bacteriol **154**(1): 200-10.

- Wagner, W. C. (1982). "Mastitis-metritis-agalactia." Vet Clin North Am Large Anim Pract **4**(2): 333-41.
- Wani, S. A., M. A. Bhat, et al. (2003). "Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhoea in India." Lett Appl Microbiol **37**(2): 121-6.
- Wasteson, Y. (2001). "Zoonotic *Escherichia coli*." Acta Vet Scand Suppl **95**: 79-84.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, et al. (1989). "In vivo formation of hybrid toxins comprising Shiga toxin and the Shiga-like toxins and role of the B subunit in localization and cytotoxic activity." Infect Immun **57**(12): 3743-50.
- Weissman, S. J., S. Chattopadhyay, et al. (2006). "Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **59**(3): 975-88.
- Welch, R. A., V. Burland, et al. (2002). "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 17020-4.
- Westerlund, B. and T. K. Korhonen (1993). "Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix." Mol Microbiol **9**(4): 687-94.
- Whipp, S. C., E. Kokue, et al. (1987). "Functional significance of histologic alterations induced by *Escherichia coli* pig-specific, mouse-negative, heat-stable enterotoxin (STb)." Vet Res Commun **11**(1): 41-55.
- Whitfield, C. and I. S. Roberts (1999). "Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **31**(5): 1307-19.
- Wieler, L. H., A. Ilieff, et al. (2001). "Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **48**(2): 151-9.
- Wieler, L. H., G. Sobjinski, et al. (2007). "Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **120**(7-8): 296-306.
- Wilson, R. A., T. J. Keefe, et al. (1988). "Strains of *Escherichia coli* associated with urogenital disease in dogs and cats." Am J Vet Res **49**(6): 743-6.
- Wirth, T., D. Falush, et al. (2006). "Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective." Mol Microbiol **60**(5): 1136-51.
- Wold, A. E., D. A. Caugant, et al. (1992). "Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics." J Infect Dis **165**(1): 46-52.
- Wold, A. E., M. Thorssen, et al. (1988). "Attachment of *Escherichia coli* via mannose- or Gal alpha 1----4Gal beta-containing receptors to human colonic epithelial cells." Infect Immun **56**(10): 2531-7.
- Wolf, M. K. (1997). "Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **10**(4): 569-84.
- Wooldridge, K. G. and P. H. Williams (1993). "Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria." FEMS Microbiol Rev **12**(4): 325-48.

- Wray, C., I. McLaren, et al. (1989). "Occurrence of 'attaching and effacing' lesions in the small intestine of calves experimentally infected with bovine isolates of verocytotoxic E coli." Vet Rec **125**(14): 365-8.
- Wu, X. R., T. T. Sun, et al. (1996). "In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9630-5.
- Wu, X. Y., T. Chapman, et al. (2007). "Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs." Appl Environ Microbiol **73**(1): 83-91.
- Yamamoto, T. and P. Echeverria (1996). "Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans." Infect Immun **64**(4): 1441-5.
- Yamamoto, T. and M. Nakazawa (1997). "Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea." J Clin Microbiol **35**(1): 223-7.
- Yeruham, I., D. Elad, et al. (2006). "A herd level analysis of urinary tract infection in dairy cattle." Vet J **171**(1): 172-6.
- Yeruham, I., D. Elad, et al. (2004). "Four-year survey of urinary tract infections in calves in Israel." Vet Rec **154**(7): 204-6.
- Yuri, K., K. Nakata, et al. (2000). "Pathogenicity of *Escherichia coli* from dogs with UTI in relation to urovirulence factors." J Vet Med Sci **62**(11): 1197-200.
- Yuri, K., K. Nakata, et al. (1998). "Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats." J Vet Med Sci **60**(3): 287-90.
- Yuste, M., R. De La Fuente, et al. (2006). "Detection of the astA (EAST1) gene in attaching and effacing *Escherichia coli* from ruminants." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **53**(2): 75-7.
- Yuste, M., J. A. Orden, et al. (2008). "Polymerase chain reaction typing of genes of the locus of enterocyte effacement of ruminant attaching and effacing *Escherichia coli*." Can J Vet Res **72**(5): 444-8.
- Zalewska, B., R. Piatek, et al. (2005). "A surface-exposed DraD protein of uropathogenic *Escherichia coli* bearing Dr fimbriae may be expressed and secreted independently from DraC usher and DraE adhesin." Microbiology **151**(Pt 7): 2477-86.
- Zdziarski, J., C. Svanborg, et al. (2008). "Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation?" Infect Immun **76**(2): 695-703.
- Zhang, J. P. and S. Normark (1996). "Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence." Science **273**(5279): 1234-6.
- Zhang, L., B. Foxman, et al. (2002). "Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2." J Clin Microbiol **40**(11): 3951-5.
- Zhang, W., M. Zhao, et al. (2007). "Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US." Vet Microbiol **123**(1-3): 145-52.

Zhang, W. L., B. Kohler, et al. (2002). "Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains." J Clin Microbiol **40**(12): 4486-92.

9. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin, die mir mit Rat und Tat geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Torsten, der über die ganze Zeit so viel Geduld und Verständnis aufgebracht hat, und mich immer wieder unterstützt und motiviert hat. Er hat mir gezeigt, dass so lange wir uns haben, alle anderen Probleme nicht so wichtig sind.

10. Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 06.01.2011

A. Schmidt