

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

Molekulare Epidemiologie und Mikroevolution
aviärer extraintestinal pathogener *Escherichia coli* (APEC)

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

vorgelegt von
Hendrik Wilking
Tierarzt aus Vechta

Berlin 2009
Journal-Nr.: 3285

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: Prof. Dr. Heribert Hofer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

CAB-Deskriptoren: escherichia coli, infections diseases, poultry diseases, nucleotide sequences, dna sequencing, cluster analysis, phylogeny; classification, epidemiology, elctrophoresis, gel, pulsedfield (MeSH)

Tag der Promotion: 02. Juli 2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-651-3

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

“Felix , qui potuit rerum cognoscere causas”

Vergil, Georgica II, 490

“Outside of a dog, a book is a man's best friend. Inside of a dog, it's too dark to read”

Groucho Marx

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	<i>Escherichia coli</i> und seine diversen Subtypen	1
1.2	Hypothesen und Rationale der vorliegenden Arbeit	2
2	Schrifttum	3
2.1	Phylogenetische Konzepte und Clusteranalysen für die molekulare bakterielle Epidemiologie	3
2.2	Die molekulare Epidemiologie durch Subtypisierung von <i>Escherichia coli</i>	4
2.3	Die biologischen Grundlagen der <i>Escherichia coli</i> -Virulenz	7
2.4	Krankheitsbilder bei Mensch und Tier ausgelöst durch extraintestinal pathogene <i>E. coli</i> (ExPEC)	10
2.5	Mobile genetische Elemente und die Mikroevolution von <i>Escherichia coli</i>	12
2.6	Phylogenie der ExPEC-Pathovare	13
3	Material und Methodik	15
3.1	Material	15
3.1.1	Gerätschaften	15
3.1.2	Bakterielle Stämme	15
3.1.3	Nährmedien, Reagenzien, Lösungen	16
3.1.4	Oligonukleotid-Primer	18
3.2	Methodik	20
3.2.1	Bakterielle Anzucht und DNS-Isolierung	20
3.2.2	MLST und Auswertung im Minimum Spanning-Tree (MSTree)	21
3.2.3	PFGE und Auswertung der Bandenmuster	21
3.2.4	Bestimmung der Virulenz-assoziierten Faktoren (VF) und Berechnung des Index	22
3.2.5	Phylogenetische Daten und Analysen	23
4	Ergebnisse	25
4.1	Die Populationsstruktur der Erreger der aviären Kolibakteriose	25
4.2	MLST entdeckt gemeinsame phylogenetische Linien in ExPEC	27
4.3	Phylogenetische Analysen bestätigen unabhängige Herkunft bei ExPEC	36
4.4	Ungleiche Verteilung der Virulenz-assoziierten Faktoren zwischen den Stämmen	39
4.5	Unterschiedliche Serotypen in den gleichen Sequenztypen bei APEC	40
4.6	Vergleich der bandenbasierten- und nukleotidbasierten Subtypisierung	41
5	Diskussion	45
5.1	Neue Einsichten in die Mikroevolution der APEC	45
5.2	Zoonotische Potentiale aus dem Blickwinkel des Genotyps	48
5.3	Das Problem der fehlenden Kongruenz zwischen PFGE und MLST	49
5.4	Grundsätzliche Überlegungen zur Auswahl von Typisierungsmethoden	51
5.5	Die Signifikanz bakterieller Populationsmodelle für die Epidemiologie	52
5.6	Die Bestimmung serologischer Gruppen und ihr phylogenetischer Hintergrund	53
5.7	DNS-Sequenzanalysen bakterieller Genome - Ein Ausblick	58
6	Zusammenfassung	61
7	Summary	63
8	Zitierte Literatur	65
9	Publikationsverzeichnis	80
10	Danksagung	82
11	Selbständigkeitserklärung	83

Tabellen

Tabelle 1	Basis für die Einteilung der Pathovaren bei <i>Escherichia coli</i>	1
Tabelle 2	Oligonukleotid-Primer	18
Tabelle 3	Aufbau des Virulenzindex ermittelt anhand der Virulenz-assoziierten Faktoren	23
Tabelle 4	Verteilung der APEC-Stämme auf die einzelnen STs der MLST	25
Tabelle 5	ExPEC-Stämme in dieser Arbeit mit ST und ST-Komplex	28
Tabelle 6	Verteilung der K1-Typen in bestimmten Clustern mit ExPEC-Stämmen	34
Tabelle 7	Vorkommen bestimmter Allele in STs und ST-Komplexen mit ExPEC	38
Tabelle 8	Virulenzindex für die Pathovaren und Genotypen in dieser Arbeit	40
Tabelle 9	Vielseitigkeit der somatischen Oberflächen-Antigene im ST20	55
Tabelle 10	Publizierte Gesamtgenome mit phylogenetischem Hintergrund	58
Tabelle 11	Indizierende SNPs für die Markierung von STs innerhalb dieser Arbeit	60

Abbildungen

Abbildung 1	Unterschiedliche phylogenetische Konzepte und Mikroevolution	3
Abbildung 2	Bildung eines phylogenetischen Baumes durch Cluster-Analysen	5
Abbildung 3	ExPEC im Minimum Spanning-Tree (MSTree) der <i>E. coli</i> -Gesamtpopulation	26
Abbildung 4	Verteilung der K1-positiven Stämme bei <i>E. coli</i> ; UPEC innerhalb der EcoR	35
Abbildung 5	Zeitpunkt des letzten gemeinsamen Vorfahren zwischen den ExPEC-Clustern	37
Abbildung 6	PFGE-Makrorestriktionsanalyse innerhalb des ST95	41
Abbildung 7	PFGE-Makrorestriktionsanalyse innerhalb des ST23	42
Abbildung 8	Tanglegramm; Basenbasierte Methode (MLST) kontra bandenbasierte Methode (PFGE)	44
Abbildung 9	Modell zur aviären Kolibakteriose	46
Abbildung 10	MSTree mit ausgewählten O-Typen und <i>E. coli</i> -Gesamtgenome	54
Abbildung 11	<i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i> -Serovaren innerhalb der Gesamtpopulation dieser Spezies	57

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A. bidest	Aqua bidest (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
adk	Gen der Adenylat-Kinase
Aer	Aerobactin
afa/draB	Gen des Afimbrial/ Dr Antigen-spezifisches Adhäsion
APEC	Aviäre pathogene <i>Escherichia coli</i>
astA	Gen des EAST-1 (Hitze stabiles Zytotoxin)
bfp	Gen der Bunding-Forming-Pili
bp	Basenpaare
BRSS	Blocking Reagenz Stock Solution
C	Cytosin
CHEF	Contour-clamped homogeneous electric field
chuA	Hämrezeptor Gen
CLDT	Cytolethal Distending Toxin
CNF	Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor
cvi/cva	Strukturgene des ColicinV Operon
crl	Gen des Curli Fiber
D	Simpsons Index für Diversität
DAEC	Diffus-adhärente <i>Escherichia coli</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eae	Attaching and Effacing-Gen
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
ECOR	<i>Escherichia coli</i> collection of reference
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ESP	EDTA-Sarcosyl-ProteinaseK
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	Extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
fimC	Gen des FimC (F1-Fimbrien)
fumC	Gen der Fumarat-Hydratase
fyuA	Gen der Yersinia Eisenaufnahme
G	Guanin
g	Gramm
gimB	Genetische Insel assoziiert mit Meningitis
gyrB	Gen der DNS-Gyrase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
hlyA	Gen des Hämolysin A
hra	Gen des hitze stabilen Agglutinin
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
icd	Gen der Isozitat-Dehydrogenase
ibeA	Gen assoziiert mit der Invasion des Gehirnendothel

<i>iha</i>	Gen des eisenregulierten Adhäsins
<i>ireA</i>	Gen des eisenwirksamen Elements
<i>iroN</i>	Gen des Katecholate-Siderophoren-Rezeptors
<i>irp2</i>	Gen des Iron-Repressible-Protein-2
<i>iss</i>	Gen des Iss
<i>iucD</i>	Gen des Aerobactin
K.i.	Konfidenzintervall
K1	Kapselantigen K1
KB	Kolibakteriose
KCl	Kaliumchlorid
<i>kpsMT II</i>	Gen spezifisch für Gruppe II- Kapseln
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LT	Hitzelabiles Toxin
<i>malX</i>	Pathogenitätsinsel-Marker für UPEC
<i>mat</i>	Gen der Meningitis-assoziierten Fimbrie
<i>mdh</i>	Gen der Malat-Dehydrogenase
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLEE	Multilocus enzyme electrophoresis analysis
mM	Millimolar
mol	mol
MSTree	Minimum Spanning Tree
n	Negativ
n. t.	Nicht typisierbar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBM	Neonatale Meningitis; „newborn meningitis“
<i>NeuC</i>	Gen spezifisch für die K1- Kapsel
<i>NotI</i>	spezielles Typ II Restriktionsenzym
nm	Nanometer
NMEC	Neugeborenen-Meningitis-assoziierte <i>Escherichia coli</i>
OD	Optische Dichte
<i>ompA</i>	Gen für das Outer Membrane Protein (Omp)
OR	Odds ratio
ORF	Offener Leserahmen „open reading frame“
p	Positiv
PAP	Pili assoziiert mit Pyelonephritis
<i>papC</i>	Gen des PapC
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<i>pic</i>	Gen für den Serin Protease Autotransporter
pmol	Pikomol
<i>purA</i>	Gen der Adenylosuccinat-Dehydrogenase
<i>recA</i>	Gen des ATP/GTP Binding Motif

RT	Raumtemperatur
<i>sat</i>	Gen für das Secreted Autotransporter Toxin
sec	Sekunden
<i>sfa/foc</i>	Gen für die S-Fimbrie und F1-Fimbrie
<i>sitD</i>	<i>Salmonella</i> Eisentransportsystem-Gen
SLV	Single Locus Variante
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus; Single nucleotide polymorphism
spez.	Spezifisch
sp.	Spezies
ST	Sequenztyp
ST	Hitzestabiles Toxin
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>Escherichia coli</i>
<i>stx</i>	Gen des Shiga-Toxin
syn	Synonym
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>tia</i>	Gen des Toxigenic Invasion Locus in ETEC Stämmen
<i>traT</i>	Gen eines Transfer-Proteins
<i>tsh</i>	Gen des Temperatur-sensitiven Hämagglutinin
U	Units
ü. N.	Über Nacht
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UTI	Urogenitaltrakt-Infektion; "urinary tract infections"
V	Volt
<i>vat</i>	Gen des Vacuolating-Autotransporter-Toxin
VF	Virulenz-assoziiertes Faktor
VT	Verotoxin
<i>XbaI</i>	Restriktionsenzym
z. B.	Zum Beispiel
ZK	Zellkultur

1 Einleitung

1.1 *Escherichia coli* und seine unterschiedliche Einteilung

Die bakterielle Spezies *Escherichia coli* besteht aus kommensalen Stämmen, die grundsätzlich nicht pathogen sind und deren Habitat der Darm ist. Zusätzlich finden sich innerhalb dieser Spezies Stämme, die für Menschen Krankheit-auslösend sind (obligat oder fakultativ pathogen). Diese Stämme können aufgrund verschiedener Eigenschaften in Pathovaren differenziert werden (Tab. 1). Die Einteilung beruht auf der Anwesenheit bestimmter Virulenz-assoziiertes Faktoren (VF), dem Verhalten in unterschiedlichen *in vitro*-Modellen oder dem Krankheitsgeschehen, in dessen Rahmen der Stamm isoliert wurde. Dieses Schema hat sich im Laufe der Zeit in Wissenschaft und Diagnostik eingebürgert und entspringt einer gewissen Pragmatik, ist aber nicht immer eindeutig.

Tab. 1: Basis für die Einteilung der Pathovaren bei *Escherichia coli*

Gruppe	Träger	Basis der Bezeichnung
Kommensale	alle	isoliert aus nicht erkranktem Träger
EHEC	Mensch, Rind	VF: <i>stx</i> , <i>eae</i> , Virulenzplasmid
STEC	Mensch, Rind	VF: <i>stx</i>
EPEC	Mensch, Säugetiere	VF: <i>eae</i> , <i>bfp</i>
ETEC	Mensch, Schwein, Rind,	VF: ST, LT
EAEC	Mensch	ZK: Adhäsive Aggregation an Hep2
DAEC	Mensch, Kalb	ZK: Diffuse Adhärenz an Hep2
EIEC	Mensch, Primaten	ZK: Invasivität
APEC (ExPEC)	Geflügel	isoliert bei septikämischen Geflügel
UPEC (ExPEC)	Mensch, Säugetiere	isoliert bei Zystitis und Nephritis
NMEC (ExPEC)	Mensch	isoliert von Neugeborenen mit Meningitis

VF= Virulenz-assoziiertes Faktor; ZK= Zellkultur; *stx*= Gen des Shiga-Toxin; *eae*= Attaching and Effacing-Gen; *bfp*= Gen der Bunding-Forming-Pili; ST= Hitzestabiles Toxin; LT= Hitzelabiles Toxin; Hep2= humane Epithelzelllinie

Es gibt Pathovaren, deren Einteilung uneinheitlich benutzt wird, die jedoch durch die Einführung von typischen und atypischen Fällen an Genauigkeit gewonnen haben (EHEC und EPEC). Auf der anderen Seite ist bei einigen Pathovaren die Abgrenzung aus phylogenetischer Sicht unklar. Dies ist z. B. bei den extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) der Fall (Hacker and Carniel, 2001).

Als eine der ersten Methoden zur Klassifizierung von *Escherichia coli*-Isolaten wurde die Typisierung aufgrund von Antigenen und die Definition von Serovaren in den 40er Jahren des vorherigen Jahrhunderts eingeführt (Orskov and Orskov, 1975). Erkennungsmerkmale innerhalb dieses Schemas sind Antigen-Strukturen auf der Oberfläche oder der Kapsel der Bakterien, die von Antikörpern erkannt werden können. Bei einigen pathogenen Stämmen konnten solche Serotypen speziellen Krankheitsbildern zugeordnet werden. Der Kapseltyp K1 ist z.B. stark mit dem Auftreten von Meningitiden und Septikämie verbunden. Für eine moderne bakteriologische Diagnostik und weitergehende molekular-epidemiologische Analysen sind diese Informationen über Antigen-Strukturen jedoch nicht ausreichend. In den 80er und 90er Jahren wurden unter anderem Methoden der Makrorestriktionsanalyse in die Bakteriologie eingeführt und bis heute auf eine Vielzahl von Stämmen angewandt (Tenover *et al.*, 1995). Mittels Restriktionsenzymen werden bakterielle Genome verdaut und mit einer

Technik wechselnder Volt-Gradienten auf einem Agarosegel mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) fraktioniert. Es entstehen Bandenmuster –auch Fingerabdrücke genannt-, die mit dafür geeigneter Software verglichen werden können.

Durch die extreme Verbesserung in der Automatisierung von DNS-Sequenzanalysen ist es seit einigen Jahren möglich geworden, große Mengen an bakterieller DNS zu sequenzanalysieren und für die bakterielle Typisierung heranzuziehen. Für die Sequenzanalysen von so genannten Haushaltsgenen wurden Schemata und Datenbanken für den weltweiten Vergleich von Stämmen aufgestellt. Für *Escherichia coli* hat sich die Methode des Multilocus Sequence-Typing (MLST) mit 7 Haushaltsgenen durchgesetzt (Wirth *et al.*, 2006). Dabei werden Unterschiede innerhalb hochkonservierten Bereiche zwischen einzelnen Stämmen detektiert und für den Vergleich herangezogen. Mit neuen technischen Methoden können weitergehend Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in Zukunft auch direkt bestimmt werden und stehen somit für eine weitere Automatisierung zur Verfügung. Die Bestimmung von Gesamtgenomen wird in Zukunft zu einer Erweiterung der Anzahl von SNPs führen, mit denen bakterielle Stämme unterschieden werden können.

1.2 Hypothesen und Rationale der vorliegenden Arbeit

Obwohl es in den letzten Jahren wichtige Fortschritte in dem Verständnis über die Spezies *E. coli* gibt, sind weitere epidemiologische und phylogenetische Studien notwendig, um die Populationsstruktur in Zusammenhang mit ihren krankheitsauslösenden Eigenschaften besser zu verstehen. Die bakterielle Phylogenie ist ein Forschungsfeld im Grenzbereich zwischen der Biologie und ihrem Interesse an Biodiversität und Evolution und der Medizin mit den einhergehenden Public Health-Fragestellungen. Beide Fachgebiete tauschen sich stark aus und teilen wichtige Herangehensweisen und Methoden. Ein sorgfältiger Blick auf diese Methoden und ihre Stärken und Limitierungen ist deshalb zwingend notwendig (Achtman, 2002).

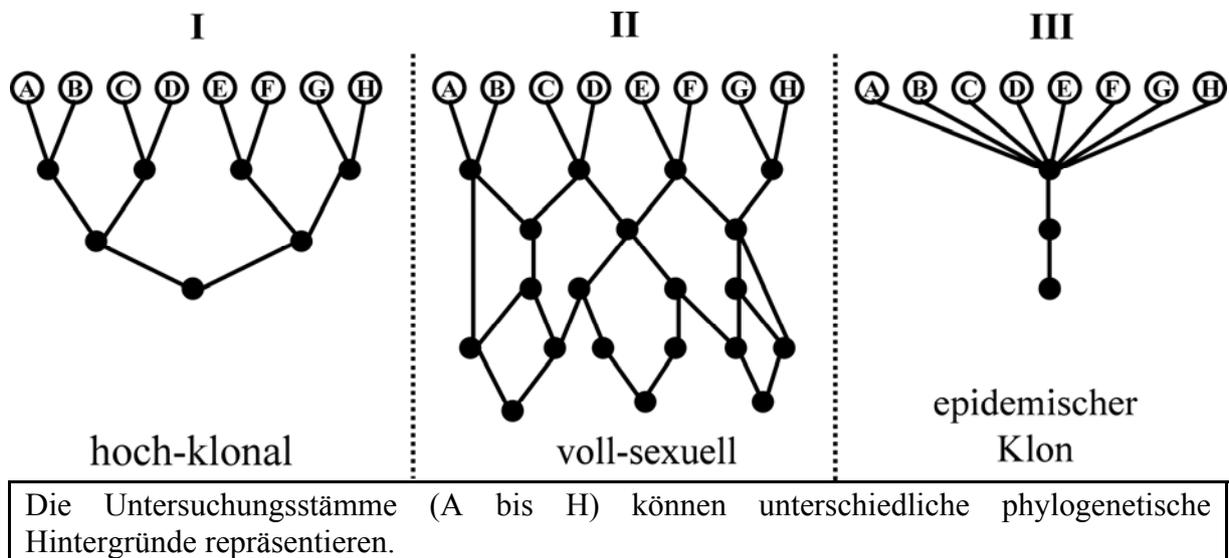
Im ersten Teil seiner Arbeit möchte der Autor dieser Dissertation anhand der öffentlich zugänglichen Datenbank zur MLST und dem eigenen Untersuchungsmaterial einen Vergleich zwischen der sequenzbasierten Methode MLST und der älteren Methode PFGE und den O-Typen vorlegen. Die Konkordanz beider Anwendungen steht hier im Mittelpunkt. Vorteile und Nachteile sollen aufgezeigt und diskutiert werden und ein Vorschlag zur Klassifikation und Typisierung der Spezies *E. coli* wird aufgezeigt. Im zweiten Teil der Dissertation wird MLST zur besseren Ausleuchtung des Genotyps der aviären pathogenen *E. coli* (APEC) innerhalb der Spezies *E. coli* angewandt. Ein zentraler Punkt ist dabei der Grad der phylogenetischen Verwandtschaft mit den uropathogenen *E. coli* (UPEC) und den Neugeborenenmeningitis-assoziierten *E. coli* (NMEC). Die genetische Variabilität bei den vorhandenen Stämmen soll dabei durch phylogenetische Analysen verdeutlicht werden. Diese Arbeit ist ein kleiner Schritt zu einem besseren Verständnis der Phylogenie von *E. coli*-Pathovaren. In der Diskussion wird ausdrücklich auf weitere Möglichkeiten, welche sich auf Basis dieser Daten auf tun, eingegangen. Die Einführung neuer Methoden im Fachgebiet der Mikrobiologie lässt in Zukunft einen tief reichenden Einblick in dieses Thema erwarten.

2 Schrifttum

2.1 Phylogenetische Konzepte und Clusteranalysen für die molekulare bakterielle Epidemiologie

Die quantitative Erhebung von Daten zur genetischen Diversität zwischen zwei oder mehreren mikrobiellen Isolaten ist die Grundlage für (i) Rückschlüsse auf die Phylogenie der jeweiligen Spezies und (ii) auf die Verbreitung und Herkunft krankheitsauslösender Erreger. Die Wahl der entsprechenden Methode für die Detektion steht dabei im Mittelpunkt. Allgemein kann man aus den Veröffentlichungen zur bakteriellen Phylogenie sagen, dass gut ausgewählte Methoden zu guten Bestätigungen von formulierten Hypothesen führen, während die „falschen“ Methoden auch immer zu einem Ergebnis führen, aber häufig einer kritischen Betrachtung nicht standhalten (Achtman, 2002). Gerade für Erreger, die in unterschiedlichen Habitaten isoliert werden und somit unterschiedlichen evolutionären Einflüssen unterliegen, muss die angewandte Methode zur vorliegenden Fragestellung wohlüberlegt ausgesucht werden.

Abb. 1: Unterschiedliche phylogenetische Konzepte und Mikroevolution



Von ausschlaggebender Bedeutung ist dabei die angenommene Populationsbiologie der betrachteten Spezies. Diese kann von hoch-klonal bis voll-sexuell (Synonym: nicht-klonal, Panmixis) reichen (Abb. 1) (Maynard-Smith and Smith, 1998; Spratt and Maiden, 1999). In hochklonalen Spezies werden genetische Veränderungen als Mutationen von Generation zu Generation weitergegeben.

Daraus lässt sich retrospektiv eine klare, binär aufteilende Phylogenie ableiten, die sich in einem Baum darstellen lässt (z.B. *Salmonella enterica*). Im Gegensatz zu den hochklonalen Arten gibt es voll-sexuelle Populationen mit nahezu freier Rekombination (z. B. *Helicobacter pylori*). Hier werden durch den horizontalen genetischen Austausch die getesteten Verbindungsdaten verwischt. Phylogenetische Beziehungen lassen sich eher als Netzwerke darstellen. Die meistens bakteriellen Spezies sind gemischt klonal-sexuell und befinden sich in der Mitte dieser beiden Extremata (z.B. *Escherichia coli*). Ein Sonderfall ist das Auftreten sogenannter epidemischer Klone. Diese sind plötzlich auftretende -evolutionär gesehen- bakterielle Typen mit hoher Fitness, die sich schnell in hohen Reproduktionsraten

weiterentwickeln und noch nicht durch horizontalen genetischen Austausch gemixt sind. Dies ist beispielsweise häufig innerhalb der Spezies *Neisseria meningitidis* der Fall (Zhu *et al.*, 2001).

Für die Implementierung von Typisierungssystemen und bei der Suche nach detektierbaren Markern im bakteriellen Genom hat dies eine entscheidende Bedeutung. Unterschiedliche Krankheitserreger bedürfen grundlegend unterschiedlicher Typisierungssysteme. Neutrale Marker, welche unter geringem evolutionärem Druck stehen, eignen sich am besten für gemischte Populationen wie *E. coli*, da hier der Effekt der Rekombination minimiert wird und dies die Stabilität der Analyse erhöht (Achtman, 2002; Maiden *et al.*, 1998). Andererseits müssen genügend polymorphe Loci präsent sein, um ein gewisses Auflösungsvermögen zu gewährleisten, so dass das Ergebnis zu einer befriedigenden Einteilung führt, die Aussagen über die Isolate zulässt. Wichtige Kriterien bei der Auswahl epidemiologischer Methoden müssen den phylogenetischen Vorstellungen zur Taxa angepasst werden, ansonsten sind sie nicht konkordant mit der Biologie des Erregers und liefern somit falsche Ergebnisse (Achtman, 2002). Die Trennschärfe einer Methode wird bestimmt durch die Fähigkeit unverwandte Stämme auch zwei unterschiedlichen Typen zuzuordnen. Es wird definiert durch den Simpson's index of diversity D .

$$D = 1 - \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)}$$

N ist die Anzahl der untersuchten Stämme und n ist die Anzahl der Stämme pro Typ, die für alle Typen summiert werden. Je höher der Wert desto größer ist die Diversität in den untersuchten Stämmen. Für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) bei *Escherichia coli* wird D als zwischen 0,895 (Nemoy *et al.*, 2005) und 0,987 (Krause *et al.*, 1996) beschrieben. Diese große Varianz zwischen den einzelnen Publikationen deutet schon auf Schwierigkeiten hin, diesen Wert genau festzulegen.

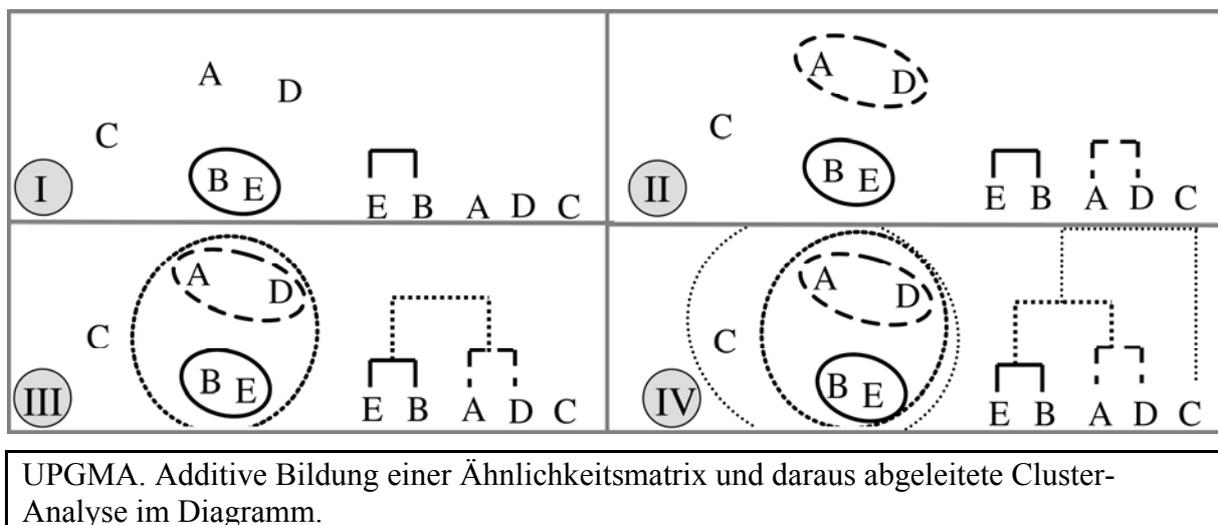
2.2 Die molekulare Epidemiologie durch Subtypisierung von *Escherichia coli*

Die Bestimmung von Typen bei Bakterien und die Formulierung von Gruppen innerhalb von Spezies durch die Detektion von bestimmten Markern ist ein wirkungsvolles Werkzeug im Hinblick auf eine zukünftige bessere Prävention bakterieller Erkrankungen und für ein besseres Verständnis der Wirt-Pathogen-Wechselwirkung. Diverse Methoden, die jeweils auf unterschiedlicher Datenbasis fußen, wurden im Laufe der Zeit eingeführt und zum Teil wieder abgelöst, was ein dauerhaftes Verständnis lange Zeit behindert hat. Ein Dauerbrenner ist die Bestimmung von somatischen (O), Kapsel-assoziierten (K) und Flagellen-assoziierten (H) Antigenen auf der Oberfläche des Bakteriums und einer Einteilung in entsprechende Typen. Die Detektion erfolgt mit Antisera. Formuliert wurden die Serogruppen schon in den 1940er Jahren anhand einer selektiven Auswahl von *E. coli*-Stämmen (Orskov *et al.*, 1976; Vahlne, 1945). Eine klare epidemiologische Beziehung zwischen Serotypen und bestimmten Krankheitsbildern ist seit jeher sehr schwierig. Die Antigensynthese wird im Falle der somatischen O-Antigene von unterschiedlichen Genen im *rfb*-locus gesteuert. Durch die sukzessive Aufklärung der Gene und ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung sind anhand der vorhandenen O-Gruppen PCR- und Microarray-basierte Detektionssysteme entwickelt worden (Anjum *et al.*, 2003; Ballmer *et al.*, 2007; Clermont *et al.*, 2006; Wang and Reeves, 1998).

Einige für ein besseres Verständnis sehr nützliche phylogenetische Studien waren von vornherein limitiert auf bestimmte Pathovaren, erreichten es aber aufgrund dieser Beschränkung nicht, ihre untersuchten Isolate in ein ganzheitliches System zusammenzufassen (Achtman *et al.*, 1983; Reid *et al.*, 2000; Whittam *et al.*, 1993). Multilocus Enzyme-Electrophoresis-Analysis (MLEE) erlangte Mitte der 80er Jahre weite Akzeptanz und ist eine effiziente Methode zur Identifizierung von Sequenzvariationen in konservierten Bereichen des bakteriellen Genoms (Selander *et al.*, 1986a). Diese basiert auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität innerhalb von Fragmenten von Haushaltsgenen. Hierbei wurde für *E. coli* eine klonale Populationsstruktur postuliert (Ochman and Selander, 1984a), was zur Aufstellung der EcoR-Kollektion (*E. coli* reference) führte (Ochman and Selander, 1984b) sowie zu der Hypothese der vier Ursprungsgruppen von *E. coli* (A, B1, B2, D). Das gute Differenzierungsvermögen der MLEE führte zu einem ständigen Auftauchen von neuen Typen. Aufgrund der komplizierten Technik waren die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Laboren und die Einhaltung der gleichen Terminologie auf die Dauer nicht zu gewährleisten. Neuerdings werden die vier postulierten phylogenetischen Gruppen sehr „reduktionistisch“ als einfaches Typisierungsverfahren mittels PCR bestimmt (Clermont *et al.*, 2000). Der inhaltliche Wert dieser Gruppen für die bakterielle Diagnostik und Epidemiologie ist gering, da aus ihnen nur begrenzte medizinische Schlussfolgerungen gezogen werden können.

PFGE nutzt das Auftreten und Verschwinden von polymorphen Restriktionsschnittstellen selten schneidender Restriktionsendonukleasen über das komplette Bakteriengenom als Marker für die Stammtypisierung. Nach der langsamen Auflösung der erhaltenen Bruchstücke mit wechselnden Volt-Gradienten auf einem Agarose-Gel wird das Vorkommen von DNS-Banden in einem bestimmten Größenbereich mittels Software (z.B.: GelCompar®, BioNumerics®, BioImage®) bestimmt. Für die Auswertung der Banden sind häufig zitierte genormte Auswertungsschemata publiziert worden (Tenover *et al.*, 1995; Tenover *et al.*, 1997). Nach der Aufstellung einer binären Vergleichsmatrix werden unterschiedliche Clustering-Algorithmen zur Erstellung eines Dendrogramms genutzt. Der Algorithmus „Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean“ (UPGMA) ist dabei das von allen Softwareprodukten angebotene und am häufigsten verwendete (Abb. 2).

Abb. 2: Bildung eines phylogenetischen Baumes durch Cluster-Analysen



UPGMA ist eine einfache von unten nach oben additive Methode für die Erstellung phylogenetischer Bäume. Es ist sehr ökonomisch bei dem Einsatz von limitierten Prozessorressourcen des verwendeten Rechners, hat aber einige bedeutende Nachteile bezüglich der wissenschaftlichen Beurteilung. Die regelmäßige Addition von neuen Verzweigungen setzt eine regel- und gleichmäßige Anhäufung von unterscheidenden Merkmalen voraus. Diese Bäume sind somit nur gültig bei konstanter Phylogenie. Im Gegensatz hierzu führen zeitlich wechselnde Evolutionsraten zur diskontinuierlichen Akquise von Merkmalen, das man als unregelmäßige molekulare Uhr bezeichnet. Hierbei verliert UPGMA die Genauigkeit.

Ein weiteres Problem ist, dass die Datenbasis für die molekularen Zusammenhänge häufig schwach ist und es zu einem Abreißen der Information über die Verbindung zweier Einträge kommt. Das Hinzufügen oder Weglassen von einzelnen Stämmen kann somit zu vollkommen neuen phylogenetischen Zusammenhängen bei den restlichen Stämmen führen. Aufgrund dessen ist eine „Bootstrap“-Analyse bei Anwendungen von UPGMA unerlässlich. Hierbei wird die Stabilität der jeweiligen Verzweigungen im Baum untersucht. Ursprünglich war die PFGE zur Analyse von Ausbrüchen gedacht, wurde aber sehr populär für den Vergleich großer Mengen von Stämmen, die über einen langen Zeitraum aus unterschiedlichen Quellen gesammelt wurden (Gerner-Smidt *et al.*, 2006; Swaminathan *et al.*, 2001). Bakterielle DNS-Fingerabdrücke durch PFGE sind heutzutage ein weit verbreitetes Typisierungswerkzeug für unterschiedliche Organismen. Sie werden sowohl für Ausbruchsanalysen als auch zur Beantwortung ausgedehnter epidemiologischer Fragestellungen herangezogen (Hilali *et al.*, 2000).

Multilocus Sequence-Typing (MLST) wurde als Methode vor zehn Jahren etabliert (Maiden *et al.*, 1998) und bisher wurden 45 öffentliche Datenbanken für viele epidemiologisch relevante Spezies installiert (www.mlst.net, www.pubmlst.org). Basis für die Methode sind polymorphe Mutationsstellen in mehreren Haushalts-Genen, da diese unter dem geringsten evolutionären Druck an die nachfolgende Generation weitergegeben werden und somit als Marker detektierbar sind. Durch die Auswahl mehrerer Loci, die über das bakterielle Genom verteilt sind, können die Beiträge von Punktmutationen und horizontalem Genaustausch zur Diversität unterschieden werden. Mit diesem Ansatz kann man Rekombination quantifizieren und die eigentlichen verwandtschaftlichen Beziehungen werden nicht verwischt. Für die Spezies *Escherichia coli*, die durch Adaptation in unterschiedlichen Habitaten vorkommt, ist dies besonders wichtig, wurde aber erst vor kurzem publiziert (Wirth *et al.*, 2006). In dieser Studie wurden mittels MLST die Eigenschaften der Population von *E. coli* und *Shigella spp.* aufgezeigt. Der Beitrag von Mutationen als auch von Rekombination konnte mittels phylogenetischer Analysen differenziert werden, so dass sogenannte „bereinigte“ phylogenetische Beziehungen dargestellt werden konnten. Im Vergleich zwischen kommensalen Stämmen und ihren pathogenen Gegenstücken wurde eine Verbindung zwischen der bakteriellen Virulenz und der Menge an lateralem Genaustausch gefunden.

MLST ist eine Methode mit großem Auflösungsvermögen und großer Spannweite. Es können nicht nur einzelne Untergruppen verglichen werden, sondern ganze Spezies werden klassifiziert. Über das Internet steht es jedem offen, seine Isolate in einem globalen System zu vergleichen und einzugliedern. Zusammen mit leistungsfähiger Analysesoftware bietet es ein System der numerischen Quantifizierung des bakteriellen Verwandtschaftsgrads zwischen einzelnen Isolaten (Harmsen *et al.*, 2003). Es ist einfach, bedienungsfreundlich und gut in der Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Labors. Für viele bakterielle Spezies hat es sich als Goldstandard für phylogenetische Untersuchungen erwiesen und ist Ausgangspunkt für jede Analyse in der molekularen Epidemiologie (Urwin and Maiden, 2003). Aufgrund der

globalen Erreichbarkeit durch das Internet geben immer mehr Nutzer Informationen ein und somit erweitert sich die Auflösung dieser Typisierungssysteme stetig von selbst (Maiden *et al.*, 1998; Enright and Spratt, 1999). Die Sequenzanalyse der Allele der MLST können in Zukunft durch Detektion der entsprechenden ausgetauschten Nukleotide „single nucleotide polymorphism“ (SNP) mit Verfahren im Hochdurchsatz verbessert werden. Es bleibt kritisch anzumerken, dass durch mangelhafte Sequenzierung der Haushaltsgene fehlerhaft Polymorphismen detektiert werden und eventuell unentdeckt in das System integriert werden könnten. Nur durch eine strikte und durchgängige Qualitätskontrolle („Kuratorfunktion“) lässt sich ein guter und fundierter MLST-Datensatz aufbauen. Bei der Datenbank zu *E. coli*, die in dieser Arbeit genutzt wird, können neue Typen nur durch Einreichung der Originaldaten der Sequenzanalyse bestätigt werden.

2.3 Die biologischen Grundlagen der *Escherichia coli*-Virulenz

Escherichia coli ist eine bakterielle Spezies im Genus *Escherichia* und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Escherich, 1885; Songer and Post, 2007). Im Laufe seiner phylogenetischen Entwicklung hat es *E. coli* geschafft, verschiedenartige Lebensräume zu besiedeln und erscheint uns somit heute als ein sehr vielseitiges Bakterium mit unterschiedlichen Eigenschaften. Schon früh wurde es als Kommensale im Gastrointestinaltrakt erkannt (Nissle, 1918) und seine Diversität im Habitat Darm, sowie seine prophylaktische Wirkung als Probiotikum stehen im Mittelpunkt der Forschung (Kleta *et al.*, 2006; Schlager *et al.*, 2002).

Die Fähigkeit von *E. coli* Krankheiten zu verursachen ist stark verbunden mit der Expression sogenannter Virulenz-assoziiierter Faktoren (VF). Unter ihnen befinden sich gewebsspezifische Adhäsine, Protektine, Toxine, eisenakquirierende Systeme und Invasine. Die Gesamtheit dieser Fähigkeiten erlaubt es dem einzelnen bakteriellen Stamm, ein spezifisches Gewebe im Wirt zu besiedeln, die wirtseigenen Abwehrsysteme zu umgehen und eine Noxe zu setzen, die den Wirt zu einer Antwort im Rahmen einer Entzündung veranlasst. Das Erscheinungsbild von unterschiedlichen Krankheitsbildern wird mit der Expression von potenten VF in Zusammenhang gebracht, was wiederum zu deren Einteilung und Benennung in Pathovaren führte (Tab. 1).

Die Adhäsion an die Oberflächenzellen der Wirte gilt vielen Autoren als ein Schlüsselfaktor bei der Virulenz von extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC). Assoziierte Gene wurden in unterschiedlichen Arbeiten entdeckt (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002; Dhomoulin and Fairbrother, 1999; Janssen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005). Adhäsine ermöglichen es *E. coli* am Wirtsgewebe zu haften. Sie verhindern somit das Abschwemmen bzw. den aktiven Abtransport des einzelnen Bakteriums. ExPEC sind in der Lage, sich am Gewebe des jeweiligen entzündeten Organs festzusetzen. Die adhäsiven Organellen bestehen unter anderem aus Curli-Fimbrien, P-Fimbrien, und Typ 1-Fimbrien und diese werden durch spezifische Gene kodiert. Durch die Adhäsine und deren Spezifität für bestimmte Oberflächenproteine auf den Wirtszellen lässt sich unter anderem der Organotropismus dieser Pathovaren erklären. Das Adhäsin, das am meisten mit uropathogenen *E. coli* (UPEC) verbunden ist, ist die P-Fimbrie (Pyelonephritis-assoziiertes Pili –PAP-). Diese Fimbrie bindet sowohl an die roten Blutkörperchen, als auch an spezifische Galaktose-Bindungseinheiten auf dem Epithel von Niere und Harnblase. Die genetische Grundlage der P-Fimbrien liegt auf einer Anordnung von 11 Genen, dem chromosomalen *pap*-Gencluster (Hacker, 1992). Die Rolle dieser Fimbrien bei aviären pathogenen *E. coli* (APEC) ist noch nicht vollständig untersucht. Es werden unterschiedliche Prävalenzraten des *pap* bei APEC publiziert, aber

nicht immer werden diese Gene auch exprimiert (Dozois *et al.*, 1995). Die meisten Stämme bilden diese wohl nicht aus. In mehreren Tierversuchen konnte herausgefunden werden, dass P-Fimbrien auch APEC bei der Adhärenz an Luftsack und Lunge helfen (Dozois *et al.*, 1995).

Zusätzlich zu diesem Mechanismus besitzen APEC und UPEC Typ 1-Fimbrien. Diese befähigen die Bakterien, an einem Mannosylglykoprotein an den Erythrozyten, im Urin oder am Respirationsepithel zu binden. Die unterschiedlichen Proteinuntereinheiten werden im chromosomalen *fim*-Gencluster kodiert (Dozois *et al.*, 1994). Die Interaktion zwischen dem *fimH* und den Blasenepithelzellen induziert eine Signalkaskade, die zu Umformungen im Zytoskelett führt und letztendlich das Einschließen des haftenden Bakteriums und die Invasion verursacht. Die Arbeit von Weissman *et al.* (2006) bietet einen tiefen Einblick in die Mikroevolution der Typ 1-Fimbrien von Neugeborenen-Meningitis-assoziierten *E. coli* (NMEC) und weiteren Stämmen, isoliert aus dem Urogenitaltrakt von Frauen. Sie läßt auf ein alternatives Habitat von pathogenen Stämmen als eine zweite Nische abseits der erkrankten Organe schließen. Es wird spekuliert, dass dies auch ein anderer Wirt sein kann, wie z.B. Vögel.

Die Zelloberfläche von *E. coli* ist eine komplexe Anordnung von Proteinen und Glykokonjugaten. Unter den Hauptoberflächenproteinen finden sich die Kapsel-Polysaccharide (K) und die Oberflächen-Polysaccharide (O). Diese Polymere sind spezifisch für den Serotyp und bilden die K- und O-Antigene der entsprechenden Methode der Serotypisierung. Die unterschiedlichen Typen entstammen Variationen der einzelnen Zucker und ihrer molekularen Verbindungen. Am Anfang wurden 167 unterschiedliche O-Gruppen definiert (Orskov and Orskov, 1975) deren Anzahl sich bis heute auf 181 erweitert hat. Es gibt 80 unterschiedliche K-Gruppen. Die Kapselpolysaccharide sind lineare Polymere von sich wiederholenden Untereinheiten und können auch Aminosäuren und Lipiduntereinheiten einschließen. Sie bedecken das Bakterium und schützen es als Protektine vor den Abwehrmechanismen des Wirtes. Die Fähigkeit der Exprimierung von Invasinen und Protektinen und der Herausbildung des entsprechenden Phänotyps korrelierend mit der K1-Kapsel wurde schon früh als ein entscheidender Virulenz-assoziiertes Faktor erkannt und auch vor dem Hintergrund der Mikroevolution diskutiert (Achtman *et al.*, 1986; Silver *et al.*, 1981). Dies hat zu der Formulierung einer umschriebenen Pathogruppe K1 geführt, die vor allem bei neonataler Meningitis, aber auch bei APEC und UPEC gefunden wird. Diese ist in der Lage bakterielle Virulenz zu fördern, indem es die Bindung von Antikörpern und Komplement und der bakteriellen Oberfläche vermindert. Außerdem wird verhindert, dass Phagozyten die bakterielle Zelle erkennen und anschließend phagozytieren können. K1 wirkt somit als eine Art Tarnkappe (Weissman *et al.*, 2006).

Extraintestinal pathogene *E. coli* besitzen teilweise die Fähigkeit der Invasion in die Wirtszellen und entkommen somit den Abwehrmechanismen. Es wurden mehrere Genloci entdeckt, die mit der Invasion von Endothelzellen in Zusammenhang stehen. Hier ist vor allem der *gimA*-Locus hervorzuheben, der auch im Zusammenhang mit der Invasion von Uroepithelzellen gefunden wird (Huang *et al.*, 1995). Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Outer Membrane Protein A (*ompA*). Dieses ist wichtig für die Bindung an die Wirtszellrezeptoren und wurde mit chronischer Pyelonephritis in Verbindung gebracht, die durch *E. coli* im Zwischenzellraum induziert wurde. Die Bakterien schützen sich durch diese Maßnahme vor den Antikörpern und dem Komplementsystem des Wirtes. Entsprechende Gene für die Invasine *ibeA* und *ompA* sind auch bei APEC vorhanden (Ewers *et al.*, 2007). Diese können bei der Fähigkeit zur Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle spielen. Alternativ ist es eventuell auch bedeutend für die Invasion des Respirationsepithels und nachfolgender Entwicklung der Septikämie bei Vögeln. Insgesamt ist die Rolle bei APEC noch nicht genau ergründet.

Die aktive Eisenaquirierung ist für viele Erreger ein essentieller Vorgang, da sie für den Abbau von Peroxiden, der DNS-Synthese und den Sauerstofftransport benötigt wird. Im Labor zeigt sich eine deutliche Verbesserung der Wachstumskinetik nach der Zugabe von Eisen. Dabei kann Eisen oder Hämin aufgenommen werden. Die Spezies *Escherichia coli* ist grundsätzlich in der Lage, die Häminaufnahmesysteme *chu* und die Eisenaufnahmesysteme Yersiniabaktin (*fyu*, *irp*), Aerobaktin (*iuc*), Salmochelin (*iro*), und Enterochelin (*ent*) zu exprimieren (Neilands, 1992). Das Aerobaktin wird hauptsächlich von extraintestinal pathogenen *E. coli* gebildet und verleiht z.B. UPEC die Fähigkeit in eisenarmen Medien zu wachsen. Es besteht aus fünf Genen, die für die Biosynthese benötigt werden und zusammen auf einem Operon liegen. Dieses kann auf einem Plasmid oder direkt im bakteriellen Chromosom lokalisiert sein. Durch das entstehende funktionelle Protein kann Fe^{3+} direkt aus den Eisenspeichersystemen des Wirtes aufgenommen werden.

ExPEC sind in der Lage unterschiedliche Toxine auszubilden, die besonders häufig bei Stämmen, die akute Infektionen auslösen, vorkommen und weniger bei chronischen Erscheinungsformen. Exotoxine werden dabei vom Bakterium direkt gegen das Wirtsgewebe eingesetzt. Das α -Hämolyysin ist bei den vielen ExPEC (v.a.: UPEC) vorhanden und ist in das Bakterienchromosom als Teil von Pathogenitätsinseln (PAI) eingeschlossen (*hly*). Es werden vier Gene exprimiert von denen *hlyA* für das eigentliche Strukturprotein kodiert. Dieses wird dann nach der Bildung von Poren durch die Bakterienmembran nach außen geschleust (Ludwig *et al.*, 1996). Entgegen seinem Namen löst das α -Hämolyysin nicht nur Erythrozyten sondern auch Leukozyten und Epithelzellen auf. Der Wirt antwortet mit Entzündungsmediatoren wie Histamin und Serotonin bzw. proinflammatorischen Zytokinen. Als weiteres extrem wirksames Toxin wird von vielen *E. coli*-Isolaten der CNF1 produziert (zytotoxischer nekrotisierender Faktor). Die Gene *cnf1/2* liegen auf dem Chromosom und produzieren ein Protein, das eine Daueraktivierung der GTPase bewirkt, was zu einer Umformung der intrazellulären Mikrofilamente des Wirtsgewebes führt und letztlich zum Zelltod (Flatau *et al.*, 1997). CNF wirkt stark nekrotisch und hemmt die Phagozytose der Bakterien. Diese Zytotoxine kommen auch bei APEC vor und sind unter anderem die Ursache für die akuten, massiven Zellschädigungen im Respirationstrakt. Im Gegensatz zu den ExPEC steht die Rolle von *E. coli* als intestinal pathogener Erreger von Durchfällen. Ein weiteres prominentes Beispiel für Steigerung der Virulenz durch Toxine ist das Shiga-Toxin. Die unterschiedlichen genetischen Erscheinungsformen (*stx1*, *stx2*) sind kodiert auf Bakteriophagen. Sie sind ausschlaggebend für die Ausbildung des vollen Krankheitsbildes des *E. coli*-induzierten enterohämorrhagischen Durchfalls und des hämolytisch-urämischen Syndroms, hauptsächlich in Verbindung mit den Typen O157:H7/H-, O111 und O26 (Karch *et al.*, 1999). Die Phagen sind hochmobil und neigen zu horizontalem Transfer. Ein Zusammenhang mit der *E. coli*-Phylogenie ist daher nicht unbedingt zu erwarten. Ob aber nur bestimmte phylogenetische Linien potentiell als Rezipienten-Stämme in Frage kommen oder dies unbegrenzt möglich ist, ist bisher nicht genau bekannt. O157 wird innerhalb der *E. coli*-Phylogenie als neu aufgetretener „pathogener Klon“ angesehen, der sich aus dem O-Typ O55 entwickelt hat (Reid *et al.*, 2000; Whittam *et al.*, 1998). Shiga-Toxin-Gene befinden sich aber in unterschiedlicher Form, bei unterschiedlichen O-Typen und in unterschiedlichen Trägern (Schmidt *et al.*, 2000; Wieler *et al.*, 1996).

Auch bei APEC-Stämmen kann man feststellen, dass viele Virulenz-assoziierte Faktoren mit pathogenen Isolaten in Verbindung gebracht werden können. Dies wurde bei einem Vergleich von Stämmen von Kolibakteriose-Fällen und von Isolaten aus gesunden Hühnern festgestellt (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Diese Gene kodieren für bestimmte Fähigkeiten wie Zell-Adhäsion, Eisenaquirierung, Toxine oder Protektine. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Verwandtschaft von APEC, UPEC und NMEC in der Übereinstimmung

dieser beschriebenen Virulenz-assoziierten Faktoren widergespiegelt wird, das im Rückschluss zusätzlich auch die Frage nach der gemeinsamen Quelle aufwirft (Ewers *et al.*, 2007; Houdouin *et al.*, 2002; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006). Welchen Einfluss die genannten Virulenz-assoziierten Faktoren und Fitnessfaktoren der Stämme auf deren Evolution haben ist eine der entscheidenden Fragestellungen für weitere Untersuchungen.

2.4 Krankheitsbilder bei Mensch und Tier ausgelöst durch extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC)

ExPEC werden nach ihrem klinischen Erscheinungsbild in drei Pathovaren eingeteilt (Tab. 1). Das Vorkommen von *E. coli*-Isolaten außerhalb des Magen-Darm-Traktes ist im allgemeinen krankheitsauslösend. Dies können bestimmte betroffene Organe sein, (z.B.: Lunge, Niere, Meningen) oder eine allgemeine, systemische Erkrankung im Rahmen einer Septikämie sein. Die Besiedlung der Organe stellt besondere Herausforderungen an diese Stämme, namentlich Membranbesiedlung, Penetration und Schutz vor der Immunantwort des Wirtes. Solche Erkrankungen kommen beim Menschen (NMEC, UPEC), den meisten Säugetieren (UPEC) und bei Vögeln (APEC) vor. Hypothesen zum Zoonose-Potential dieser Erreger entstanden durch die genetische Ähnlichkeit der ExPEC-Stämme untereinander und sind zusätzlich durch Fall-Kontroll-Studien belegt (Manges *et al.*, 2007). Tiefer gehende phylogenetische und molekularbiologische Untersuchungen müssen dieses noch abklären.

Die Kolibakteriose bei Vögeln verursacht hohe Morbidität und Mortalität. Sie ist eine beträchtliche Bedrohung für die moderne Geflügelhaltung und kann zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen führen. Sowohl extensive als auch intensive Haltungssysteme von Legehennen und Broilern sind betroffen. Das gleiche gilt auch für Puten, Wassergeflügel, und sogar Wildvögel und Ziervögel (Gross, 1994; Janssen *et al.*, 2001). Die Übertragung der Erreger erfolgt horizontal zwischen den Tieren und den Tierställen sowie auch vertikal über verschmutzte Eierschalen oder direkt auf das Ei. Haupteintrittspforte ist der Respirationstrakt und die Erregeraufnahme erfolgt nach heutiger Ansicht aus der kontaminierten Stallluft oder durch mit Kot verunreinigtes Trinkwasser. Infektionen mit *E. coli* führen beim Geflügel vor allem zur Pneumonie und Luftsackentzündung mit nachfolgender Septikämie und systemischen Erkrankungen und dem Befall von Herzbeutel, Leber und Bauchfell (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999; Ewers *et al.*, 2003; Vandemaele *et al.*, 2002). Die Erkrankung kann innerhalb weniger Tage zum Tod der Tiere führen.

E. coli, die im Zusammenhang mit diesem Krankheitsgeschehen beim Geflügel isoliert werden, heißen aviäre pathogene *E. coli* (APEC). Erstaunlicherweise besitzen aber nicht alle APEC-Stämme sämtliche beschriebenen Faktoren, was auf unterschiedliche Mechanismen bei der Pathogenese hindeutet. Grundsätzlich kann folgende Abfolge bei der Pathogenese angenommen werden:

1. Adhäsine sorgen für die Anheftung der eingeatmeten *E. coli* am Respirationsepithel des Vogels.
2. Protektine verhindern eine schnelle Immunreaktion des Wirtes und der Erreger kann sich vermehren.
3. Toxine schädigen das Respirationsepithel und setzen somit Eisen frei.
4. Entweichen der Immunantwort des Wirtes durch Invasion des Respirationsepithels und anderer Zellen mittels Invasinen. Die Infektion wird systemisch (Septikämie).

5. Zerstörung der Blutzellen durch Hämolyse und weitere Aufnahme von Eisen durch die entsprechenden Systeme.
6. Fimbrien sorgen für die Anheftung an unterschiedliche innere Organe.

(Vandemaële *et al.*, 2002; Ewers *et al.*, 2003; Dho-Moulin and Fairbrother, 1999)

Bakterielle Harnwegsinfekte sind Infektionen der ableitenden Harnwege. Die Prävalenz liegt bei jungen Frauen bei 5,4% pro Jahr und steigt im höheren Alter auf 23% an. Junge Männer sind selten betroffen, während im Alter die Inzidenzrate sich derjenigen der Frauen zunehmend angleicht. Grundsätzlich ist das Urogenitalsystem so aufgebaut, dass Harnleiter und Blase einen Rückfluss von Urin zu den Nieren verhindern. Bakterien werden durch die Miktion ausgewaschen und ein Großteil des gesunden Urogenitaltraktes ist steril. Der niedrige pH-Wert und die Osmolarität des Urins wirken inhibitorisch auf das bakterielle Wachstum. Zusätzlich verhindern die unspezifischen Abwehrmechanismen der Mukosa und des Plattenepithels des Wirts ein Eindringen der anatomisch nahen Darmflora. Nichtsdestotrotz führen kolonisierende Bakterien aus den Fäzes oder der Perianalregion zu Zystitiden und durch aufsteigende Infektion zu Nephritiden und Pyelonephritiden. Folgende Risikofaktoren wurden in Zusammenhang mit Urogenitaltraktinfektionen beim Menschen ermittelt (Hahn *et al.*, 2004):

- Katheterisierung und ähnliche instrumentelle Eingriffe
- Verkürzte Urethra und ähnliche anatomische Abnormalitäten
- Nierensteine oder andere Obstruktionen
- Prostatahyperplasie beim Mann
- Diabetes mellitus/Immunsuppression
- Diaphragma bei der Frau
- Sexuelle Aktivität
- Schwangerschaft

Uropathogene *E. coli* (UPEC) verursachen 70% bis 95% aller bakteriellen Infektionen des Urogenitaltraktes bei Frauen und Männern (UTI). Diese Stämme besitzen eine Vielzahl von Virulenz-assoziierten Faktoren, die es ihnen ermöglichen, am Urogenitaltrakt zu haften, in den Zellen der Blase zu persistieren und eine Noxe zu setzen. Außerdem können sie der menschlichen Immunantwort entkommen und führen zu periodisch wiederkehrenden Krankheitserscheinungen (Mulvey *et al.*, 2000). UPEC werden auch bei Hunden, Katzen und Rindern in Zusammenhang mit Blasenentzündungen isoliert (Kurazono *et al.*, 2003). Teilweise werden Isolate mit UPEC-spezifischen VFs auch bei anderen Tieren detektiert (Schierack *et al.*, 2008).

Neonatale bakterielle Meningitis (NBM) durch *E. coli* tritt meistens kurz nach der Geburt auf und ist endemisch in Entwicklungsländern wie auch in Ländern mit hohem Standard in der peripartalen Versorgung. Auslöser sind Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli* (NMEC). Die Inzidenz der Erkrankung ist in den Vereinigten Staaten bei 1.00 bis 4.000 Kindern pro Jahr (0,025 bis 0,1 pro Geburt). Die Letalität ist hoch und neurologische Folgeschäden sind häufig (Stoll, 1997). Die Erreger gelangen über den Nasopharynx oder den

Gastrointestinaltrakt in den Blutstrom und werden so zu den Meningen getragen. Ungefähr 80% aller NMEC-Isolate tragen das K1 Kapsel-Antigen, das mit der Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen verbunden ist (Kim, 2001). Über das Auftreten von *E. coli*-Meningitis bei Tieren ist wenig bekannt.

2.5 Mobile genetische Elemente und die Mikroevolution von *Escherichia coli*

Tiefgreifendes Wissen wurde durch die Analyse genetischer Faktoren, die mit der Virulenz der Stämme in Verbindung stehen, gewonnen. Die unterschiedlichen Pathovaren produzieren unterschiedliche Virulenz-assoziierte Faktoren. Die kodierenden Gene können im bakteriellen Chromosom oder auf Bakteriophagen und Plasmiden liegen. Ihre Mikroevolution ist Gegenstand unterschiedlicher Untersuchungen, bei denen die Mobilität und der horizontale Austausch zwischen Linien besonders beachtet werden muss.

Viele der Virulenz-assoziierten Gene bei *E. coli* liegen auf dem Chromosom und sind dabei häufig innerhalb von so genannten Pathogenitätsinseln (PAI) organisiert. Durch deren Anwesenheit kann das entsprechende bakterielle Isolat gleichzeitig mehrere seiner krankmachenden Eigenschaften erhalten (Hacker and Kaper, 2000; Mühldorfer and Hacker, 1994). Einige dieser Faktoren sind in der Lage über den horizontalen Genaustausch mobilisiert zu werden. Dies wird von einigen Autoren als einer der stärksten Kräfte bei der Evolution von *E. coli* angesehen (Hacker and Kaper, 2000). PAIs sind große DNS-Abschnitte, die häufig mit tRNA-Genen verbunden sind und von wiederholenden Elementen (direct repeats) begleitet werden. Der GC-Gehalt der PAI-Bereiche unterscheidet sich von den übrigen DNS-Bereichen des Bakteriengenoms, was für die Theorie der Aufnahme dieser Gene aus anderen Organismen spricht (Groisman and Ochman, 1996). Die tRNA-Gene dienen dabei als Integrationsstellen für die Fremd-DNS und so genannte Integrasen und Transposasen sorgen für das Ausschneiden bzw. das Einfügen. Insgesamt führte dieses Bild zu der Vorstellung, dass PAIs sich aus mobileren Elementen wie Phagen und Plasmiden entwickelt haben. Für einige phylogenetische Linien war es unter bestimmten Voraussetzungen günstig, diese dauerhaft zu integrieren und ihre Elimination zu verhindern.

Die Pathogenitätsinseln bei UPEC und ihr Zusammenhang zum phylogenetischen Hintergrund stehen im Mittelpunkt der bakteriologischen Forschung. Die UPEC Prototyp-Stämme CFT073 und 536 sind vollständig sequenzanalysiert und im 536 wurden insgesamt sechs PAIs identifiziert (I-VI) (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2002). Dabei wurde unter anderem herausgefunden, dass in einigen Fällen die PAIs von unterschiedlichen UPEC-Stämmen identische Gene tragen können und in der Sequenz große Ähnlichkeit zueinander haben (Dobrindt *et al.*, 2002). Die Virulenz-assoziierten Gene auf den PAIs reagieren auf die jeweiligen Umweltbedingungen und unterliegen komplexen Regelkreisläufen. Die entsprechenden Gene liegen auf den PAIs selber, in anderen PAIs oder im Chromosom. Es besteht somit eine Wechselwirkung zwischen den erworbenen Faktoren und den nicht-mobilen Elementen, mit erheblicher Auswirkung auf die generelle Fitness des Bakteriums und somit auch auf die Evolution phylogenetischer Linien (Hacker *et al.*, 2003). Es gibt auch kleine Varianten der PAIs, die „pathogenicity islets“ genannt werden. Das Eisenaufnahmesystem *chu* ist unter anderem so innerhalb des Stammes 536 integriert.

Phagen sind Viren, die auf Bakterien als Wirtszelle spezialisiert sind und können ihr Genom unter bestimmten Umständen in das Wirtszellgenom einfügen (Temperenz). Dies erfolgt immer an einer definierten Stelle im Genom und ein eigener Reproduktionsapparat ist nicht vorhanden. Dabei können sie kodierende Bereiche für Virulenz-assoziierte Faktoren horizontal übertragen (z.B.: *stx*). Temperente Phagen sind sehr wirtsspezifisch und werden

danach als Coliphagen, Salmonellaphagen o.ä. benannt. Plasmide sind extrachromosomale, autonom replizierende DNS-Elemente. Sie können eine Vielzahl von Funktionsgenen enthalten, die sie unabhängig von den bakteriellen chromosomalen Genen replizieren können (z.B.: *cvi/cva*). Viele Plasmide haben die Fähigkeit zur Konjugation d.h. zum Austausch zwischen einzelnen Bakterien und versetzen damit andere Linien in die Lage einen neuen Phänotyp auszuprägen. Sowohl Phagen als auch Plasmide sind hochmobile genetische Einheiten und ein Zusammenhang zwischen der Langzeit-Epidemiologie von *E. coli* und ihrem Vorkommen ist zunächst nicht zu erwarten, da beides in unterschiedlichen Entwicklungszeiträumen stattfindet. Inwiefern es aber bestimmte phylogenetische Linien gibt, die die Integration dieser mobilen Elemente fördern bzw. welche dazu nicht in der Lage sind, bleibt Gegenstand der mikrobiologischen Forschung.

2.6 Phylogenie der ExPEC-Pathovaren

Die Manifestation von *E. coli*-induzierten Krankheiten außerhalb des Darms verwirrte lange Zeit Mikrobiologen und Kliniker. Anfangs wurde vermutet, dass diese Formen durch einfache fakultativ pathogene Darmbesiedler ausgelöst werden. In einer frühen Studie an Stämmen, die neonatale Meningitiden auslösen und aus dem Darm gesunder Menschen isoliert wurden, zeigten sich die pathogenen Stämme in ihrer Diversität nur wenig vermindert (Selander *et al.*, 1986b). Die biologische Vielfalt von *E. coli* wurde lange Zeit durch die EcoR-Referenzkollektion repräsentiert. Diese Zusammenstellung von Stämmen sollte repräsentativ für die gesamte phylogenetische Bandbreite der Spezies *Escherichia coli* sein. Bei deren Etablierung fanden sich UPEC-Stämme in allen propagierten Gruppen. NMEC- und APEC-Stämme wurden in dieser Studie nicht eingeschlossen (Ochman and Selander, 1984b). Dies behinderte zunächst eine genaue Einsicht in die Phylogenie der ExPEC. Spätere umfangreichere Arbeiten fanden heraus, dass besonders die EcoR-Gruppen B2 und D reich an ExPEC-Stämmen sind (Boyd and Hartl, 1998; Dobrindt *et al.*, 2003). Eine scharfe Abgrenzung zu anderen Pathovaren gelang durch diese phylogenetischen Analysen jedoch nicht. Daher blieb es zunächst ungeklärt, ob diese Infektionen durch umschriebene Untergruppen ausgelöst werden oder eventuell gar nicht von den anderen abgrenzbar sind. Heute weiß man, dass ExPEC hochspezialisierte Erreger sind und sich in ihrer Virulenzausstattung von intestinal pathogenen und nicht-pathogenen *E. coli* unterscheiden (Boyd and Hartl, 1998; Ewers *et al.*, 2007; Welch *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2006).

Die beschriebenen Pathogene scheinen aber nicht auf einen Träger und ein Krankheitsbild reduziert zu sein, da genetische Ähnlichkeiten beobachtet werden können und ein Zoonosecharakter somit wahrscheinlich ist. Diese Vermutung wird verstärkt durch die Tatsache, dass diese Erreger ein ähnliches extraintestinales Habitat teilen und ExPEC teilweise mit den gleichen Virulenz-assoziierten Faktoren ausgestattet sind (Ewers *et al.*, 2007). Mehrere Veröffentlichungen haben aufgezeigt, dass es auch signifikante phylogenetische Schnittmengen zwischen APEC, UPEC und NMEC gibt (Feng *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008; Le Gall *et al.*, 2007; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007). Die Deutungen der Autoren weisen auf ein potentiell gemeinsames Reservoir hin, das sich diese Stämme teilen und aus welchem sie ihre Virulenzeigenschaften beziehen. Darüber hinaus können ExPEC auch potentiell als direkte Zoonose-Erreger eine Gefahr darstellen. In der Studie von Wirth *et al.*, (2006) wurde aufgedeckt, dass die Diversität von *E. coli* auf einem signifikanten Anteil an horizontalem Genaustausch beruht. Bemerkenswerterweise war in den phylogenetischen Analysen dieser Veröffentlichung die Uniformität der Abstammungsgruppe innerhalb K1-positiver Stämme größer als in *Shigella* oder intestinal pathogenen Pathovaren - ja sogar größer als in den nicht-pathogenen Isolaten (Wirth *et al.*, 2006). Dieser Assoziation zwischen

einem Virulenz-assoziierten Faktor und der phylogenetischen Analyse aus den Haushalts-Genen deutet auf einen großen Einfluss dieses Kapseltyps auf die Evolution einzelner Linien innerhalb von *E. coli* hin.

Aus den aufgezeigten Arbeiten kann sicher gesagt werden, dass APEC, UPEC und NMEC ähnlicher zueinander sind als zu ihren intestinal pathogenen und nicht-pathogenen Gegenstücken. Wie weit dies geht und ob es überhaupt möglich ist, sie voneinander abzugrenzen, ist fraglich. Tiefergehende phylogenetische Untersuchungen können weitere Subtypen der ExPEC aufdecken und zu einem neuen Überblick sowie einer neuen Nomenklatur führen. Außerdem ist dies wichtig für ein neues Verständnis der Mikroevolution dieser Stämme und für die Auswahl von Prototyp-Stämmen für molekularbiologische Untersuchungen.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Gerätschaften

Brutschränke	Heraeus, Typ B6060
Elektrophoresekammern	AGS; Hybaid; MWG
Fluorometer	Hoefer DyNA Quant™ 200
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30
pH-Meter	Knick 766 Calimatic
Photospektrometer	Amersham Pharmacia Biotech Ultraspec™ 3000 pro
Pipetten	Eppendorf
Pulsfeld-	Rad Chef-DRÒ III™ System; Electrophoresis Cell;
Gelelektrophoresekammer	BioRad-Cooling Module
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, C 24 Incubator Shaker
Sequenzierung	Applied Biosystems 3700 automated sequencer
Spannungsgerät	Hybaid PS 250
Sterilwerkbank	Steag Laminarflow-Prozeßtechnik
Thermocycler	Perkin Elmer GeneAmp™ PCR System 2400
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D
Transilluminator	Herolab; E.A.S.Y. 429K; ICU-1; Video-Graphik Printer UP 890 CE
UV-Tisch	Biometra TI 1
Vortexer	IKA MS2 Minishaker
Waage	Sartorius LA 230S und BP 2100
Wärmeschrank	WTC Binder
Wasserbäder	Julabo; Th. Karow GmbH

Folgende Software wurde bei der Erstellung und graphischen Verarbeitung genutzt:

Aufbereitung der Chromatogramme	Staden Package 1.6.0	(Staden, 1996)
Datenbank und Datenaufbereitung	Access 2003	Microsoft
Erkennung der SNPs	MegAlign, Lasergene	DNASStar Inc.
Nukleotid-Analyse	DNASP 4.10.7	(Rozas <i>et al.</i> , 2003)
MLST-Datenbank und Grafiken	BioNumerics 4.6	Applied maths Inc.
Statistische Auswertung	WinEpiscope 2.0	(Thrusfield <i>et al.</i> , 2001)
Tanglegramm	Treemap 1.0	(Charleston, 1998)
Verarbeitung Gesamtgenome	Kodon 3.1	Applied maths Inc.

3.1.2 Bakterielle Stämme

Eine Übersicht über sämtliche verwendeten Stämme (151) für die Untersuchungen der extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) mittels Multilocus Sequence-Typing (MLST) findet sich in Tab. 5. Diese Stämme wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht und in die öffentliche Datenbank unter <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst/dbs/Ecoli> eingetragen. 106 der Stämme stammen von unabhängigen und typischen Fällen von aviärer Kolibakteriose und werden nachfolgend aviäre pathogene *E. coli* (APEC) genannt, davon 81 aus Deutschland, neun aus Kanada, vier aus den Niederlanden, jeweils drei aus Jordanien, USA und Brasilien und zwei aus der Volksrepublik China. 68% der APEC-Stämme stammen

vom Huhn, 14% von der Pute, 12% aus Enten und die übrigen vom Strauß, Sperling und Sittich. Sie stammen aus einer Kollektion von 394 APEC-Stämmen, dem Stand innerhalb der Stammsammlung am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen zu Beginn dieser Arbeit. Sie wurden ausgewählt mittels vorhandener Daten zum Vorbericht und bereits erhobenen epidemiologischen Daten aus Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und einiger Virulenz-assoziierten Faktoren (Janssen, 2002). Es wurde versucht, die gesamte Diversität der vorhandenen Stämme in die MLST-Analyse einzuschließen. Ergänzt wurden diese APEC-Stämme durch 30 uropathogene *E. coli*-Stämme (UPEC) von Urogenital-traktinfektionen aus Deutschland, Schweden, Chile und USA, sowie 15 Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli*-Stämme (NMEC) von Fällen von neonataler Meningitis aus Deutschland, USA und Finnland. Einige dieser Stämme wurden schon in vorherigen Studien analysiert (Carvalho de Moura *et al.*, 2001; Dozois *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Mellata *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005) und gelten als Prototyp-Isolate. Für die Vergleichsanalyse zwischen MLST und PFGE wurden 66 Stämme zusätzlich mit PFGE untersucht. Diese sind auch in Tab. 5 in Spalte 4 markiert.

Basis für unsere Stammauswahl bei der Betrachtung der *E. coli*-Population ist die MLST-Datenbank für *E. coli* und *Shigella spp.* und für *Salmonella enterica* des Max Planck Instituts für Infektionsbiologie, öffentlich zugänglich unter <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst/dbs/Ecoli>. Zum Zeitpunkt der Auswertung befanden sich 2.105 Stämme in der Datenbank (Oktober 2008) wobei in der weiteren Analyse nur die 2.021 *E. coli*-Stämme eingeschlossen und die Shigellen ausgeschlossen wurden. Diese gruppieren sich in 898 Sequenztypen (STs) und 51 Sequenztyp-Komplexen (ST-Komplexe). Teil dieser MLST-Datenbank sind die bekannten *E. coli*-Referenzkollektionen EcoR und DEC (Whittam *et al.*, 1993; Ochman and Selander, 1984). Für die Analysen im Minimum Spanning-Tree (MSTree) in den Abbildungen der Abb. 3, 4, 5, 10 und 11, wurde eine Teilmenge aus der oben genannten Datenbank genommen, um Veröffentlichungen anderer Forschungsgruppen nicht vorzugreifen.

3.1.3 Nährmedien, Reagenzien, Lösungen

Inkubation der Stämme

<u>LB-Medium</u> (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 min
<u>LB-Agar</u> (Luria Bertani)	NaCl	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	10,00 g/l
	Hefeextrakt	5,00 g/l
	1 N NaOH	1,00 ml
	Agar	15,00 g/l
		pH 7,0+0,2 autoklaviert bei 121 °C, 15 min

<u>Blutagar (Nähragar I)</u>	Pankreatisches Pepton (Fleisch)	
	Pankreatisches Pepton (Gelantine)	5,00 g/l
	Pankreatisches Pepton (Casein)	5,00 g/l
	Eiweißhydrolysat	5,00 g/l
	Hefeextrakt	3,50 g/l
	NaCl	3,50 g/l
	Agar	5,00 g/l
		10,00 g/l
	autoklaviert bei 121 °C, 15 min	pH 7,0+0,2
		abkühlen auf 45-50°C
	anschließend Zugabe von 5% defibriniertem Schafblut	

PCR und Agarose-Gelelektrophorese

<u>10 x PCR buffer</u>	Tris-HCl, pH 8,4	200 mM
	KCl	500 mM

Taq DNA Polymerase native

Invitrogen

dNTP2

Invitrogen

PCR Nucleotide Mix:
dATP, dCTP, dGTP, dTTP

jeder dNTP 10 mM

TBE-Puffer Stamm-

Lösung (10 x konz.)

Tris	890 mM	107,82 g
Borsäure	890 mM	55,03 g
EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
eingestellt mit NaOH		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		0,100 ml

Agarose

Agarose		1,00 – 1,50 g
		auf 100 ml
		1 x TBE

Ethidiumbromidlösung 1 %

Pulsfeld-Gelelektrophorese

<u>ESP-Puffer</u>	EDTA	500 mM	18,62 g
	Sarcosyl	3,4 mM	1,00 g
	pH 9,5 eingestellt mit NaOH		
			auf 100 ml A. bidest
	Porteinase K		1,80 mg/ml

<u>TE Puffer</u>	Tris	10 mM	1,21 g
	EDTA	10 mM	3,72 g
	pH 7,5		
			auf 1000 ml A. bidest

<u>TBE-Puffer Stamm-Lösung (10 x konz.)</u>	Tris	890 mM	107,82 g
	Borsäure	890 mM	55,03 g
	EDTA-Lsg. pH 8,0	500 mM	18,62 g
	eingestellt mit NaOH		auf 100 ml
			auf 1000 ml A. bidest

<u>Enzympuffer für XbaI</u>	Tris	10 mM	0,12 g
	NaCL	50 mM	0,06 g
	MgCl ₂	10 mM	0,20 g
	pH 8,0 eingestellt mit NaOH		
	Mercaptoethanol	10 mM	0,78 ml
			auf 100 ml A. bidest
	Bovines Serumalbumin		0,1 mg/ml

3.1.4 Oligonukleotid-Primer

Für die Detektion bestimmter Genabschnitte der VFs des Virulenz-Index und die Produktion von PCR-Produkten innerhalb der MLST wurden folgende Oligonukleotid-Primer eingesetzt (Tab. 2). S: Sense; A: Antisense; Größe des Produktes in Basenpaaren (bp).

Tab. 2: Oligonukleotid-Primer

Gen	Name	Primersequenz (5' – 3')	bp
<i>adk</i>	Adenylat-Kinase	S: ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG A: CCGTCAACTTTCGCGTATTT	583
<i>fumC</i>	Fumarat-Hydratase	S: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC A: GTACGCAGCGAAAAAGATTC	806
<i>gyrB</i>	DNS-Gyrase	S: TCGGCGACACGGATGACGGC A: GTCCATGTAGGCGTTCAGGG	911
<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	S: ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCA CA A: GGACGCAGCAGGATCTGTT	878
<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase	S: ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCT GGCGG A: TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATA	932

Gen	Name	Primersequenz (5' – 3')	bp
		TCTTTCTT	
<i>purA</i>	Adenylosuccinat-Dehydrogenase	S: CGCGCTGATGAAAGAGATGA A: CATACGGTAAGCCACGCAGA	816
<i>recA</i>	ATP/GTP Bindungsmotiv	S: ACCTTTGTAGCTGTACCACG A: TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	780
<i>afa/draB</i>	Afimbrial/ Dr Antigen-spezifisches Adhäsion	S: TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG A: CCAGTAACTGTCCGTGACA	810
<i>crl</i>	Curli fiber Gen	S: TTTCGATTGTCTGGCTGTATG A: CTTCAGATTCAGCGTCGTC	250
<i>fimC</i>	Typ 1-Fimbrie (D-mannose spez. adhäsion)	S: GGGTAGAAAATGCCGATGGTG A: CGTCATTTTGGGGTAAGTGC	477
<i>hra</i>	Hitzestabiles Agglutinin	S: TCACTTGCAGACCAGCGTTTC A: GTAACTCACACTGCTGTCACCT	537
<i>iha</i>	Eisenreguliertes Adhäsion	S: TAGTGC GTTGGGTTATCGCTC A: AAGCCAGAGTGGTTATTCGC	609
<i>papC</i>	Pilus assoziiert mit Pyelonephritis	S: TGATATCACGCAGTCAGTAGC A: CCGCCATATTCACATAAC	501
<i>sfa/foc</i>	S-Fimbrie und F1C-Fimbrie	S: GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA A: CGGAGAACTGGGTGCATCTTA	1242
<i>tsh</i>	Temperatur-sensitives Hämagglutinin	S: ACTATTCTCTGCAGGAAGTC A: CTTCCGATGTTCTGAACGT	824
<i>mat</i>	NBM-assozierte und temp.-regulierte Fimbrie	S: TATACGCTGGACTGAGTCGTG A: CAGGTAGCGTCGAACTGTA	899
<i>chuA</i>	Hämrezeptor-Gen	S: GACGAACCAACGGTCAGGAT A: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	278
<i>fyuA</i>	<i>Yersinia</i> Eisenaufnahme (Yersiniabaktin Rezeptor)	S: GCGACGGGAAGCGATGACTTA A: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	774
<i>ireA</i>	Eisenwirksames Element	S: ATTGCCGTGATGTGTTCTGC A: CACGGATCACTTCAATGCGT	384
<i>iroN</i>	Katecholate Siderophoren Rezeptor	S: ATCCTCTGGTCGCTAACTG A: CTGCACTGGAAGAAGTGTCT	847
<i>irp2</i>	Iron repressible protein (Yersiniabaktin-Synthese)	S: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC A: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	413
<i>iucD</i>	Aerobaktin-Synthese	S: AAAAAAGTTCTATCGCTTCC A: CCTGATCCAGATGATGCTC	714
<i>sitD</i> (chro.)	<i>Salmonella</i> Eisentransport-system-Gen (chromosomal)	S: ACTCCCATACACAGGATCTG A: CTGTCTGTGTCCGGAATGA	554
<i>sitD</i> (epis.)	<i>Salmonella</i> Eisentransport-system-Gen (Plasmid)	S: TTGAGAACGACAGCGACTTC A: CTATCGAGCAGGTGAGGA	1052
<i>cvi/cva</i>	Strukturgene des Colicin V Operon (Mikrozin-ColIV)	S: TCCAAGCGGACCCCTTATAG A: CGCAGCATAGTTCCATGCT	598
<i>iss</i>	Increased serum survival	S: ATCACATAGGATTCTGCCG	309

Gen	Name	Primersequenz (5' – 3')	bp
		A: CAGCGGAGTATAGATGCCA	
<i>neuC</i>	K1 Kapsel-Polysaccharid	S: GGTGGTACATTCCGGGATGTC A: AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676
<i>kpsMTII</i>	Gruppe II Kapelantigene	S: CAGGTAGCGTTCGAACTGTA A: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	280
<i>ompA</i>	Outer membrane protein	S: AGCTATCGCGATTGCAGTG A: GGTGTTGCCAGTAACCGG	919
<i>traT</i>	Transfer-Protein	S: GTGGTGGCGATGAGCACAG A: TAGTTCACATCTTCCACCATCG	430
<i>astA</i>	EAST1 (Hitze stabiles Zytotoxin)	S: TGCCATCAACACAGTATATCC A: TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGACGGC	116
<i>cnf1/2</i>	Zytotoxischer nekrotisierender Faktor	S: TCGTTATAAAATCAAACAGTG A: CTTTACAATATTGACATGCTG	446
<i>sat</i>	Secreted autotransporter toxin	S: TGCTGGCTCTGGAGGAAC A: TTGAACATTCAGAGTACCGGG	667
<i>vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin	S: TCCTGGGACATAATGGCTAG A: GTGTCAGAACGGAATTGTC	981
<i>hlyA</i>	Hämolyysin A	S: GTCCATTGCCGATAAGTTT A: AAGTAATTTTTGCCGTGTTTT	352
<i>gimB</i>	Genetische Insel assoziiert mit NBM	S: TCCAGATTGAGCATATCCC A: CCTGTAACATGTTGGCTTCA	736
<i>ibeA</i>	Invasion des Gehirnepithels	S: TGGAACCCGCTCGTAATATAC A: CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	342
<i>tia</i>	Toxigenic invasion locus in ETEC-Stämmen	S: AGCGCTTCCGTCAGGACTT A: ACCAGCATCCAGATAGCGAT	512
<i>pic</i>	Serin-Protease Autotransporter	S: ACTGGATCTTAAGGCTCAGG A: TGGAATATCAGGGTGCCACT	409
<i>malX</i>	Pathogenitätsinsel-Marker des CFT073	S: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA A: TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	922

3.2 Methodik

3.2.1 Bakterielle Anzucht und DNS-Isolierung

Die bearbeiteten Proben stammen aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen oder wurden aus externen Stammsammlungen zugesandt. Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte auf Blutagarplatten bei 37 °C. Jeweils eine Kolonie einer über Nacht bebrüteten Blutagarplatte wurde in ein mit 5 ml LB-Medium gefülltes Reagenzröhrchen überimpft und bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator bebrütet. Von dieser Bakterienkultur wurden 1,0 ml entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNS-Isolierung erfolgte mittels MasterPure Genomic DNA Purification Kit Epicentre, (Biozym, Hessisch Oldendorf) nach Anleitung. Dieses Vorgehen ermöglicht es, auf einfache und schnelle Weise genomische DNS aus Bakterien zu gewinnen und in der Polymerase-Kettenreaktion einzusetzen. Die Bakterienkultur wurde mit der Zentrifuge pelletiert. Mit

Hilfe eines Lysis-Puffers wurden die Zellen 5 Minuten bei 80°C lysiert. Danach erfolgte ein Verdau mit RNase A und störende RNA-Reste wurden entfernt. Mit Isopropanol wurde die genomische DNS ausgefällt und in mehreren Schritten mit Zentrifugation (30 Sek, 25°C, 16.000 g) und 70%igem Ethanol gereinigt. Anschließend wurde die gewonnene DNS im Fluorometer quantifiziert.

3.2.2 MLST und Auswertung im Minimum Spanning-Tree (MSTree)

Die sieben Haushalts-Gene (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) sind für das MLST-Schema (www.mlst.net) sequenzanalysiert worden. Die PCR-Bedingungen für das PCR-Produkt waren wie folgt: Denaturierung: 94°C für 30 s; Annealing, 57°C für 30 s; Extension, 72°C für 60 s; 35 Wiederholungen. Vorwärts- und Reverse-Strang wurden mit einem Applied Biosystems 3700 automated sequencer bei der Firma AGOWA GmbH sequenzanalysiert. Die resultierenden DNS-Sequenzen wurden als Chromatogramme mit der Software Staden package übereinandergelegt und an den vorgegebenen Enden geschnitten. Die Qualität der erhaltenen Chromatogramme und der daraus resultierenden DNS-Sequenz wurde sowohl von der Software als auch visuell kontrolliert und fehlerhafte DNS-Sequenzen wurden wiederholt. Identische Allele der untersuchten Gene bekommen eine Allel-Nummer (Allel-Typ). Jede einzigartige Zusammenstellung von Allel-Typen innerhalb eines Isolates bezeichnet man als Sequenztyp (ST).

Als Methode für das Clustering und die grafische Präsentation wurde der Minimum Spanning-Tree (MSTree) innerhalb der Software BioNumerics 4.60 (Applied maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) genutzt. Durch den implementierten Algorithmus wird dem Nutzer der Baum präsentiert, der sämtliche Einträge mit der geringsten Länge miteinander verbindet. Dieses reduktionistische System erklärt somit die Diversität in der Spezies *E. coli* mit so wenigen Veränderungen wie möglich. Mehrere, ähnliche STs werden zu Sequenztyp-komplexen (ST-Komplexe) zusammengefasst. Diese beinhalten mindestens drei STs und nur STs, die sich mindestens 6 Allele teilen (persönliche Empfehlung Mark Achtman). Sie sind nach dem ST mit dem höchsten Vorkommen (Primär-Genotyp, oder „founding genotype“) innerhalb des ST-Komplex benannt. Bei der Cluster-Analyse ist die Formulierung von hypothetischen Typen ist innerhalb des Algorithmus begrenzt zugelassen, soweit dies höchstens in einem hypothetischen Typen in der Entfernung zwischen zwei STs resultiert. Da der Datensatz aus von in einem langen Zeitraum isolierten Stämmen stammt, kann nicht davon ausgegangen werden das er komplett ist und die volle Biodiversität repräsentiert. Für die Recherche nach Sequenzen von *E. coli*-Gesamtgenomen wurden folgende Seiten genutzt:

- <http://www.genomesonline.org/> (GOLD)
- http://www.sanger.ac.uk/Projects/Escherichia_Shigella/ (Sanger)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj> (NCBI).

Elf der vollständig sequenzanalysierten bakteriellen Genome aus Tab. 10 sind von anderen Nutzern der MLST-Datenbank eingegeben. Neun weitere Gesamtgenome wurden von öffentlichen Zugängen heruntergeladen. Mittels der Software Kodon 3.1 (Applied maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) wurden diese anhand der Stämme MG1655 und EDL933 annotiert und die Allele der Haushalts-Gene zur phylogenetischen Untersuchung genutzt.

3.2.3 PFGE und Auswertung der Bandenmuster

Die genomische DNS der Proben wurde in Agarose-Blöckchen (pulsed-field certified agarose, BioRad, München) eingeschlossen und 4 Stunden mit *XbaI* verdaut. Die

Auftrennung der Fragmente erfolgte mit einer Contour-clamped homogeneous-electric field-Kammer (CHEF DR III; BioRad, München) in 0,5% Tris-Borat-EDTA und einer Spannung von 6 V/cm. Die Laufzeit war 22 Stunden, der Winkel 120° und die Pulsdauer verlängerte sich in der Zeit von 5s auf 50s. Als Größenstandard wurde ein polymerisierter Lambda-Phagen-Marker (48.5 bis 1,018.5 kb) beidseitig mit der Elektrophorese aufgetrennt. Zur Normalisierung der einzelnen Gele und zum Vergleich zwischen unterschiedlichen Läufen wurde das Programm BioNumerics benutzt. Nur die Banden innerhalb der Spannweite von 48,5 Kilo-Basenpaare und 679,0 Kilo-Basenpaare wurden weiter zum Vergleich herangezogen, da die Auflösung in niedrigen und hohen Bereichen zu ungenau für eine genaue Analyse ist. Innerhalb des Programmalgorithmus wurden die Banden zu 54 unterschiedlichen Bandenklassen zugeordnet (band matching). Aus der Anwesenheit und Abwesenheit einer Bande wurde innerhalb der Software eine binäre Vergleichsmatrix „similarity matrix“ geschaffen. Dazu wurde der Dice-Koeffizient benutzt, der einzig auf dem Vorhandensein einzelner Banden beruht und ihre Intensität ausdrücklich nicht berücksichtigt. Die Dendrogramme in den Abb. 6 und 7 wurde berechnet mit UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) einer Distanz-basierten Clustering-Methode.

Zur Kalibrierung der Einstellungen für die Positionstoleranz und Optimierung wurden zwei unabhängige Läufe mit dem Stamm IMT5155 genutzt, die in der Vergleichsmatrix und vom Clustering-Algorithmus obligat als gleich erkannt werden mussten. Die optimalen Einstellungen für die Positionstoleranz wurden von BioNumerics als 0,59% für Abb. 6, 0,58 für Abb. 7 und 0,72 für den PFGE-Teil aus Abb. 8 errechnet (Seite 54 bis 56). Bootstrap-Werte für 1.000 Wiederholungen wurden mit der gleichen Software berechnet und dem Diagramm beigelegt. Für eine genaue Betrachtung der Diversität von PFGE-Mustern innerhalb eines Sequenztyps (ST) wurden der ST95 und ST23 genutzt, da diese beiden STs die höchste Prävalenz in der Untersuchungsgruppe hatten. Eine Einteilung in PFGE-Cluster nach einem festgelegten Wert wäre willkürlich gewesen und wurde deshalb bewusst vermieden. Für den Vergleich mit den MLST-Daten wurden die DNS-Sequenzen der Haushaltsgene der entsprechenden Sequenztypen ebenfalls mit dem Dice-Algorithmus und UPGMA geclustert. Sowohl PFGE als auch MLST-Baum wurden als Nexus-Datei aus BioNumerics exportiert und in das Programm TreeMap 1.0 importiert (Charleston, 1998). Ursprünglich wurde diese Software zum Vergleich von Wirt-Parasit-Kophylogenien konzipiert. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit des visuellen Nebeneinanderlegens von zwei Bäumen genutzt. Jedes Ende im PFGE-Baum wurde mit dem entsprechenden ST zusammengefügt. Als Diagramm ergibt dies ein Tanglegram zum Vergleich der Kongruenz zweier Methoden.

3.2.4 Bestimmung der Virulenz-assoziierten Faktoren (VF) und Berechnung des Index

Für eine quantitative Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Phylogenie und dem Nachweis von Virulenz-assoziierten Faktoren wurden die genetischen Daten aus der Studie von Ewers *et al.* (2007) genutzt. Hier wurden für die gleichen Stämme 31 Gene bestimmt, die in Zusammenhang mit extraintestinalen *E. coli*-Erkrankungen gebracht werden konnten (Tab. 3).

Positive Ergebnisse für jeden VF wurden addiert und der Mittelwert für jeden ST-Komplex an Stämmen angegeben. Dies wurde ohne Unterscheidung des Typs vom VF gemacht. Eine Wichtung der einzelnen Gene nach ihrer Bedeutsamkeit ist nicht wissenschaftlich begründet durchführbar.

Tab. 3: Aufbau des Virulenzindex ermittelt anhand der Virulenz-assoziierten Faktoren

Typen	VF
Adhäsine	<i>afa/dra; csgA; fimC; hra; iha; papC; sfa/foc; tsh; mat</i>
Eisenaquirierung	<i>chuA; fyuA; ireA; iron; irp2; iucD; sitD</i> chromosomal; <i>sitD</i> episomal
Protektine	<i>cvi/cva; iss; ompA; traT</i> (ohne K1)
Toxine	<i>EAST-1; cnf1/2; sat; vat; hlyA</i>
Invasine	<i>gimB; ibeA; tia</i>
andere	<i>malX; pic</i>

Außerdem ist das Vorkommen einiger Faktoren aneinander gekoppelt und somit sind einige Daten eventuell korreliert. Andererseits kann sich eine gewisse Korrelation der VFs innerhalb der Daten aus der Auswahl der Stämme ergeben (Selektions-Bias). Davon abgesehen soll der Index ein Maß für die erworben Virulenz darstellen. Ein gewisser Ausgleich der Verzerrungen wird durch die hohe Anzahl getesteter Faktoren (31) bei allen Stämmen erreicht. Die Anzahl positiv und negativ getesteter VF wurde für jede Gruppe aufsummiert. Diese Summen wurden für die jeweiligen Vergleichsgruppen in einer Vierfeldertafel aufgetragen und Odds ratios (OR) errechnet. Obere und untere Konfidenzgrenzen wurden mittels eines χ^2 Näherungswertes für jedes OR gebildet (Tab. 8). Bei einem unteren Konfidenzniveau kleiner als eins wird der Test als „Alternativhypothese nicht bestätigt“ und somit als nicht statistisch signifikant angesehen.

Zur Bestimmung des K1 Kapselantigens wurde das *neuC*-Gen mittels PCR amplifiziert. (Watt *et al.*, 2003). Dies wurde validiert mit einer PCR für ein K1-spezifisches Produkt innerhalb des *kpsMTII*-Genlokus (Johnson and Stell, 2000). Unterschiedliche Ergebnisse wurden in der Analyse als „widersprüchlich“ berücksichtigt. Die Serotypen wurde von Dr. Hartmut Steinrück am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bestimmt. Dies geschah durch Röhrenagglutination mit Kaninchen-Anti-*E. coli* Immunsere, die, basierend auf ein Panel von serologischen Teststämmen produziert werden, und die *E. coli* O-Gruppen 1 bis 181 und *E. coli* H-Gruppen 1 bis 56 detektieren (Orskov *et al.*, 1977).

3.2.5 Phylogenetische Daten und Analysen

Der Zeitpunkt des letzten gemeinsamen Vorfahren zwischen ausgewählten ST-Komplexen, dem Laborstamm MG1655 und dem *Salmonella enterica enterica* Serovar Typhimurium Prototyp-Stamm LT2 wurde durch die Anzahl der synonymen Mutationsstellen und dem errechneten mittleren Abstand (D_s) zwischen den einzelnen STs in allen sieben Allelen bestimmt. Die Bestimmung von D_s erfolgte mit der Software DNASP 4.10.7 (Rozas *et al.*, 2003). Für die Zuweisung des Leserahmens zwischen Start-Codon und Stop-Codon der sieben Haushalts-Gene wurden die offenen Leserahmen aus der öffentlichen Datenbank GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) genutzt und den jeweiligen Allelen zugewiesen. Als genetischer Code wurde derjenige von *Escherichia coli* angegeben. Als Molekulare Uhr (K_s) für *E. coli* wurde mit 7×10^{-10} die Rate von Wirth *et al.*, (2006) verwendet. Folgende Formel wurde für die Berechnung herangezogen:

$$Age = \frac{D_s}{K_s}$$

Die Bildung der *E. coli*-Abstammungsgruppen (A, B1, B2, D) für die Cluster in Abb. 3 stammen aus einer Populationsanalyse mittels der Software STRUCTURE, in denen

Individuen unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden können (Falush *et al.*, 2003). Diese Analyse wurde für die MLST bei *E. coli* von Wirth *et al.* (2006) publiziert und die Ergebnisse sind für die entsprechenden ST in der öffentlichen Datenbank erhältlich. Vier Hauptgruppen der Herkunft wurden in dieser Analyse angenommen. Die Ergebnisse bestätigen die Zuweisungen in der EcoR-Kollektion und benutzen auch die gleiche Nomenklatur der Gruppen (A, B1, B2, D) (Selander *et al.*, 1987).

Für die Detektion der indizierenden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in Tab. 11 wurde ein multiples Alignment von sämtlichen DNS-Sequenzen aus der öffentlichen MLST-Datenbank, die ExPEC-Stämme enthalten, mittels der Software MEGALIGN (DNASStar Inc.) erstellt. Dieses Programm erlaubt die visuelle Darstellung von einzelnen Nukleotidaustauschstellen mittels einer farblichen Kodierung. Stellen, die spezifisch für einen ST oder ST-Komplex sind, wurden in die Tabelle eingetragen.

4 Ergebnisse

4.1 Die Populationsstruktur der Erreger der aviären Kolibakteriose

Multilocus Sequence-Typing (MLST) ist in der Lage, bakterielle Spezies zu charakterisieren und in dieser Arbeit wird diese Eigenschaft genutzt, um die Phylogenie einer Zusammenstellung von 151 extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämmen (ExPEC) im Zusammenhang mit der *E. coli*-Gesamtpopulation zu untersuchen. Der größte Anteil dieser Auswahl stellen 106 aviäre pathogene *E. coli* (APEC), die anhand von schon vorhandenen Daten zum Vorbericht, Virulenz-assoziierten Faktoren und Restriktionsanalyse ausgesucht wurden. Sie spiegeln somit die größtmögliche Diversität bei APEC in der vorhandenen Stammsammlung wider. In diesen APEC-Isolaten wurden 38 unterschiedliche Sequenztypen (ST) identifiziert (Tab. 4). Die meisten Stämme befinden sich mit annähernd 20% im ST95, gefolgt vom ST23 und dem ST117. Der ST88 ist eine Single Locus Variante (SLV) von ST23 und der ST140 eine SLV von ST95 und beide beinhalten jeweils 7 bzw. 6 APEC-Stämme. Es gibt somit drei dominierende phylogenetische Gruppen (Cluster) von APEC. In den weiteren 35 STs wurden nur ein bis drei Isolate identifiziert. Diese Stämme beweisen, dass es zusätzlich auch phylogenetische Linien gibt, die aviäre Kolibakteriose auslösen können, dieses aber im Vergleich zu den Clustern nur vereinzelt tun.

Tab. 4: Verteilung der APEC-Stämme auf die einzelnen STs der MLST

Anzahl Stämme	Sequenztypen (ST)
21 (19,8%)	ST95
13 (12,3%)	ST23
11 (10,4%)	ST117
7 (6,6%)	ST88,
6 (5,7%)	ST140
je 3	ST101, ST141, ST155
je 2	ST10, ST93, ST135, ST155, ST355, ST359, ST369
je 1	ST38, ST57, ST70, ST100, ST104, ST118, ST125, ST126, ST162, ST347, ST348, ST349, ST350, ST351, ST352, ST356, ST357, ST358, ST363, ST365, ST368, ST370, ST371, ST372, ST373

Prozentangaben sind Anteile des entsprechenden STs an allen untersuchten APEC (106).

In Tab. 5 sind sämtliche MLST-Untersuchungsstämme mit Daten zum klinischen Vorbericht, der geographischen Herkunft und dem Pathovar aufgeführt. In einer genaueren Betrachtung der einzelnen APEC-Isolate zeigt sich, dass die Entwicklung der APEC-Cluster in ST95, ST23 und ST117 unabhängig vom Zeitpunkt der Probennahme und der geographischen Herkunft ist. Der ST95 enthält Stämme aus sechs unterschiedlichen Ländern und der ST23 Isolate, die aus Deutschland und Kanada stammen.

Die 11 APEC aus dem ST117 stammen ebenfalls aus sechs unterschiedlichen Ländern. Bei den beschriebenen Clustern handelt es sich nicht um geographisch begrenzte Ansammlungen von Proben aus bestimmten Gegenden. Diese Ergebnisse implizieren, dass hier APEC-Stämme aus einer weltweiten Verteilung endemischer phylogenetischer Gruppen nachgewiesen wurden. Die Stämme innerhalb der Cluster können mittels der sieben Allele der Haushalts-Gene nicht weiter differenziert werden. Trotz der phylogenetischen Unterschiede verursachen sie weltweit die gleiche Erkrankung bei Tieren.

Abb. 3: ExPEC im Minimum Spanning-Tree (MSTree) der *E. coli*-Gesamtpopulation

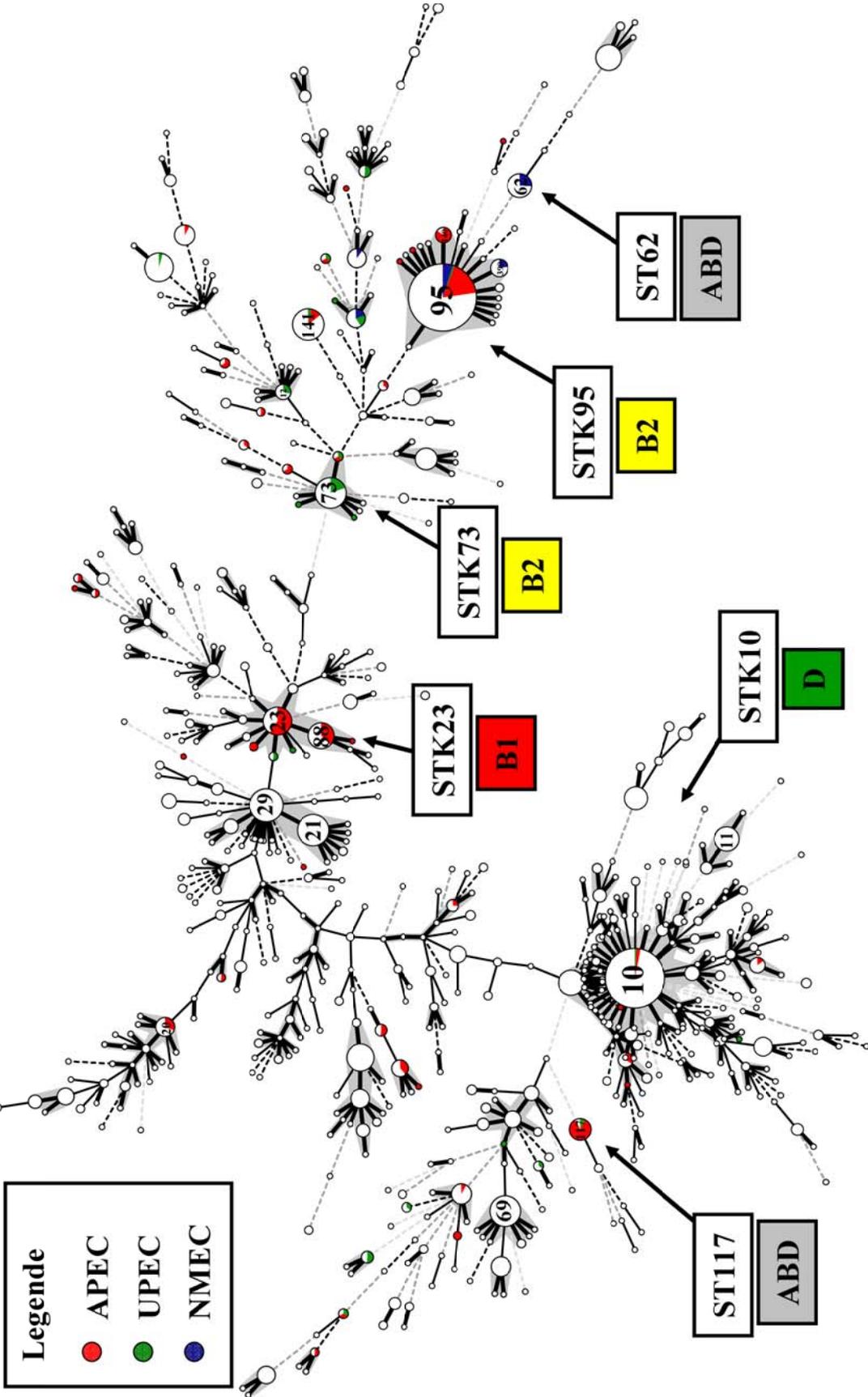


Abb. 3: Sequenztypen (ST) werden als Kreise präsentiert, deren Radius proportional zur Anzahl der gefundenen Stämme ist. Die Stärke der schwarzen Verbindungslinien repräsentiert die Anzahl der gemeinsamen Allele und somit den Grad der phylogenetischen Verwandtschaft. Die phylogenetischen Gruppen (A, B1, B2, D) sind angegeben nach Wirth *et al.* (2006). ABD: ST-Komplexe mit gemischtem genetischem Material aus allen phylogenetischen Gruppen. Grundlage dieses phylogenetischen Baumes sind 1.588 *E.coli*-Stämme aus der öffentlichen Datenbank.

Minimum Spanning-Tree (MSTree) ist eine Auswertemethode, bei der die Sequenzanalysen einer Vielzahl von Stämmen innerhalb einer Spezies gleichzeitig ausgewertet werden können. Damit lässt sich die Populationsstruktur von *E. coli* visualisieren und einzelne Untergruppen können, entsprechend ihrer Bedeutung, hervorgehoben werden und im Kontext der Gesamtpopulation betrachtet werden. In Abb. 3 wird dieses Verfahren für die Untersuchungsstämme dieser Arbeit angewandt. Die einzelnen beschriebenen STs wurden mit den anderen DNS-Sequenzen, die in der öffentlich zugänglichen Datenbank eingegeben worden sind, verglichen. In dieser Datenbank finden sich auch kommensale und intestinal pathogene *E. coli* und sie repräsentiert somit die Variabilität in dieser Spezies. Dadurch erhält man ein umfassendes Bild von der Diversität einzelner Pathovaren innerhalb der Gesamtpopulation. Außerdem können so mehrere verwandte STs zu Sequenztyp-Komplexen (ST-Komplexe) zusammengefügt und so besser verglichen werden.

In der Abb. 3 werden unter anderem sämtliche 106 APEC-Stämme dargestellt (rot). Diese gruppieren sich, wie schon beschrieben, an drei Stellen in der *E. coli*-Population. Die meisten APEC werden im ST-Komplex 95 gefunden, einige sind gebündelt im ST-Komplex 23 und 11 Isolate im ST117. Zusätzlich sind 39,6% aller APEC-Stämme fast gleichförmig über den gesamten Stammbaum verteilt. Sie finden sich somit in vielen Teilen der Gesamtpopulation wieder. Daraus lässt sich schließen, dass es unter den Erregern der aviären Kolibakteriose gleichzeitig sowohl einzelne phylogenetische Linien mit hohem Vorkommen gibt, wie auch die sporadische und mehrfache Entstehung von APEC in diversen unterschiedlichen phylogenetischen Linien.

4.2 MLST entdeckt gemeinsame phylogenetische Linien in ExPEC

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) Stämme zu beleuchten, wurden zusätzlich zu den APEC in Abb. 3 auch 30 uropathogene *E. coli* (UPEC) mittels MLST untersucht und im MSTree (grün) visualisiert. Von diesen Stämmen stammen 22 von Frauen, 5 von Hunden und 2 von Katzen. 26,7% dieser UPEC befinden sich im ST-Komplex 73, der auch 2 APEC und den internationalen Referenzstamm CFT073 beherbergt (Welch *et al.*, 2002). Diese phylogenetische Gruppe scheint ein wichtiger Ursprung für uropathogene Stämme zu sein. Die anderen UPEC sind gleichförmig über die Population verteilt, ähnlich zu der Situation bei APEC. Der Prototyp-Stamm UPEC 536 (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006) ist nicht im gleichen ST mit irgendeinem anderen ExPEC-Stamm innerhalb dieser Analyse. Die EcoR-Stämme 7, 11, 48, 60 und 64 repräsentieren UPEC in der EcoR-Referenzkollektion und sind ebenfalls über mehrere STs verteilt (Abb. 4). Keiner dieser Stämme hat seinen Ursprung im ST-Komplex 73. UPEC wurden in allen drei APEC-assoziierten Clustern (Kap. 4.1) gefunden. Je zwei Stämme im ST-Komplex 95 und ST-Komplex 23 und einer in ST117. Daraus lässt sich ableiten, dass diese beiden Pathovaren mit MLST nicht in allen Fällen zu unterscheiden sind und phylogenetisch Ähnlichkeiten aufweisen.

Tab. 5: ExPEC-Stämme in dieser Arbeit mit ST und ST-Komplex

ST-Komplex-(n)	ST-(n)	Stamm	PFGE	Pathovar	Serotyp	Wirt; Erkrankung; Herkunft	neuC/kps/MT	Referenz
		RS218	N	NMEC	O18:K1:H7	Mensch; NBM; USA	p/p	(Kim, 2001)
		IMT4525	J	APEC	O1:K1:H7	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2545	J	APEC	O1:K1:H-	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2087	J	APEC	O78:H9	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2470	J	APEC	O2:K1:H5	Huhn; KB; D	p/p	(Ewers <i>et al.</i> , 2005)
		MT78	J	APEC	O2:K1:H+	Huhn; KB	p/p	(Mellata <i>et al.</i> , 2003)
		TK3	J	APEC	O1	Pute; KB; Kan.	p/p	(Mellata <i>et al.</i> , 2003)
		IHE3055	N	NMEC	O1:K1:H7	Mensch; NBM; Fin	p/p	(Achtman <i>et al.</i> , 1983)
		B10363	N	NMEC	O1:K1:H7	Mensch; NBM;	p/p	(Dobrint and Hacker, 2001)
		IMT9280	N	UPEC	O1:K1:H7	Mensch; UTI; D	p/p	Diese Arbeit
		B13155	N	NMEC	K1	Mensch; NBM; D	p/p	(Dobrint and Hacker, 2001)
		CN151	J	APEC	O2	Huhn; KB; Kan.	p/p	(Dozois <i>et al.</i> , 2000)
		BE1-2928	N	NMEC	O18:K1	Mensch; NBM; USA	p/p	(Achtman <i>et al.</i> , 1983)
		IHE3034	N	NMEC	O18:K1:H7	Mensch; NBM; Fin	p/p	(Dobrint and Hacker, 2001)
95-(39)	95-(28)	IMT2097	J	APEC	O1:K1:H7	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2099	J	APEC	O18:H7	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2108	J	APEC	Osp.:H7	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2250	J	APEC	On.t.:H7	Pute; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2252	J	APEC	On.t.:K1:H7	Pute; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2297	J	APEC	O2:K1:H5	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2491	J	APEC	O2:H6	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2545	J	APEC	O18:K1:H7	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT4517	J	APEC	O2:K1:H7	Pute; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT4518	J	APEC	O1:K1:H7	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT8899	J	APEC	O1:K1	Strauss; KB; NL	p/p	Diese Arbeit
		IMT9232	J	APEC	O1:K1:H7	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT9241	J	APEC	O2:K1:H4	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT9698	J	APEC	O2:K1	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit

ST- Komplex-(n)	ST-(n)	Stamm	PFGE	Pathovar	Serotyp	Wirt; Erkrankung; Herkunft	neuC/ kpsMT	Referenz
140-(2)		IMT5155	J	APEC	O2:K1	Huhn; KB; D	p/p	(Li <i>et al.</i> , 2005)
		IMT2278	J	APEC	O76:H7	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2288	J	APEC	O2:K1:H5	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2469	J	APEC	O2:K1:H5	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2492	J	APEC	O2:H5	Huhn; KB; Jor	p/p	Diese Arbeit
		IMT4534	J	APEC	O2:K1:Hsp	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
95-(39)		IHE3036	N	NMEC	O18:K1:H7	Mensch; NBM; Fin	p/p	(Dobrindt and Hacker, 2001)
		IHE3080	N	NMEC	O18:K1:H7	Mensch; NBM; Fin	p/p	(Dobrindt and Hacker, 2001)
370-(1)		248	N	APEC	O35	Huhn; KB; USA	p/p	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005)
		IMT8894	N	APEC	O2:K1	Flamingo; KB; Ho	p/p	Diese Arbeit
368-(1)		IMT2254	N	APEC	On.t.:H-	Ente; KB; D	p/p	Diese Arbeit
		IMT2125	J	APEC	O78:H9	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
23-(13)		CN34	J	APEC	O78	Huhn; KB; Kan.	n/n	(Dozois <i>et al.</i> , 2000)
		CN165	J	APEC	O78	Huhn; KB; Kan.	n/n	(Dozois <i>et al.</i> , 2000)
		CN139	J	APEC	O78:K8	Huhn; KB; Kan.	n/n	(Dozois <i>et al.</i> , 2000)
		IMT1932	N	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1935	N	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1936	N	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2089	J	APEC	On.t.:H-	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2094	J	APEC	O78:H-	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2101	J	APEC	O160:H12	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2283	J	APEC	Osp:H6	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2467	J	APEC	O78:H-	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT8994	J	APEC	O2:H5	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
	23-(25)		IMT1930	J	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n
		IMT664	N	APEC	O78:H-	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1431	J	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1432	N	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1433	N	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT4541	J	APEC	On.t.:H4	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
88-(7)		IMT1930	J	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT664	N	APEC	O78:H-	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1431	J	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1432	N	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT1433	N	APEC	O78:H-	Ente; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT4541	J	APEC	On.t.:H4	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit

ST-Komplex-(n)	ST-(n)	Stamm	PFGE	Pathovar	Serotyp	Wirt; Erkrankung; Herkunft	<i>neuC</i> / <i>kpsMT</i>	Referenz
23-(25)	88-(7)	IMT9587	N	APEC	O9	Huhn; KB; Kan.	n/n	Diese Arbeit
	369-(2)	IMT2352	N	APEC	O78:H-	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT9003	N	APEC	O78:H6	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2120	N	APEC	On.t.:H5	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
117-(12)	360-(1)	ABU84 (EcoR 71)	N	UPEC	O78:HM	Mensch; UTI; Swe	n/n	(Ochman and Selander, 1984)
	367-(1)	IMT6008	N	UPEC	On.t.:H-	Hund; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
		UEL29	N	APEC	O102:H-	Huhn; KB; Bra	n/n	(Carvalho de Moura <i>et al.</i> , 2001)
		V-2	N	APEC	O2:H4	USA	n/n	(Horne <i>et al.</i> , 2000)
		C33	N	APEC	O78:K8	Huhn; KB; Kan.	n/n	(Dozois <i>et al.</i> , 2000)
		U-7	N	UPEC	O114:H-	Mensch; UTI; Chi	n/n	Diese Arbeit
		IMT2102	J	APEC	O24:H4	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2105	J	APEC	O101:K32	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT2489	J	APEC	O78:H4	Huhn; KB; Jor	n/n	Diese Arbeit
		IMT2490	J	APEC	O161:H4	Huhn; KB; Jor	n/n	Diese Arbeit
		IMT4516	J	APEC	O24:H4	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT4529	J	APEC	O24:H4	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
73-(11)	73-(5)	IMT9242	N	APEC	On.t.:H-	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT9586	N	APEC		Huhn; KB; Kan.	n/n	Diese Arbeit
		CFT073	N	UPEC	O6:K2:H5	Mensch; UTI; USA	n/n	(Welch <i>et al.</i> , 2002)
		AD 110	N	UPEC	O6:K2:H7	Mensch; UTI	n/n	(Johanson <i>et al.</i> , 1992)
		B6985-2	N	UPEC	O6:H1	Mensch; UTI; D	n/n	(Dobrindt and Hacker, 2001)
		IMT9096	N	UPEC	O2:H1	Mensch; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT9289	N	UPEC	O6:H1	Katze; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
	355-(2)	IMT2112	N	APEC	O2:H5	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT8998	N	APEC	O2:H5	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
	104-(2)	IMT2518	N	APEC	On.t.:H1	Pute; KB; D	n/n	Diese Arbeit
		IMT9402	N	UPEC	On.t.:H1	Hund; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
	353-(1)	IMT1200	N	UPEC	O18:H1	Mensch; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
375-(1)	IMT9206	N	UPEC	O6:H1	Katze; UTI; D	n/n	Diese Arbeit	

ST-Komplex-(n)	ST-(n)	Stamm	PFGE	Pathovar	Serotyp	Herkunft	Wirt; Erkrankung;	neuCl/ kps/MT	Referenz
62-(4)		RS179	N	NMEC	O7:K1:H-	Mensch; NBM; USA		p/p	(Achtman <i>et al.</i> , 1983)
		C183/77	N	NMEC	O7:K-:H-	Mensch; NBM; USA		p/p	(Achtman <i>et al.</i> , 1983)
		RS176	N	NMEC	O7:K1:H-	Mensch; NBM; USA		p/p	(Achtman <i>et al.</i> , 1983)
		Ve239	N	NMEC		Mensch; NBM; D		p/p	(Dobrint and Hacker, 2001)
10-(3)		C97 (EcoR 11)	N	UPEC	O6:H10	Mensch; UTI; Swe		n/n	(Ochman and Selander, 1984)
		IMT9238	N	APEC	On.t.:H6	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
101-(3)		IMT9706	N	APEC	O119	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
		IMT2113	N	APEC	On.t.:H-	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
		UEL31	N	APEC	O5:H10	Huhn; KB; Bra		n/n	(Carvalho de Moura <i>et al.</i> , 2001)
361-(1)		UEL17	N	APEC	On.t.:H5	Huhn; KB; Bra		n/n	(Carvalho de Moura <i>et al.</i> , 2001)
		B6998	N	UPEC	On.t.:H-	Mensch; UTI; D		n/n	(Dobrint and Hacker, 2001)
155-(3)		IMT1937	N	APEC	O78:H51	Ente; KB; D		n/n	Diese Arbeit
		IMT1938	N	APEC	O78:H51	Ente; KB; D		n/n	Diese Arbeit
		IMT1939	N	APEC	O78:H51	Ente; KB; D		n/n	Diese Arbeit
14-(2)		764	N	UPEC	O18:K5:H-	Mensch; UTI; D		n/n	(Dobrint and Hacker, 2001)
		C70 (EcoR 64)	N	UPEC	O75:HM	Mensch; UTI; Swe		n/n	(Ochman and Selander, 1984)
359-(2)		IMT5475	N	APEC	O8:H4	Ente; KB; VC		n/n	Diese Arbeit
		IMT5494	N	APEC	O29:H51	Ente; KB; VC		n/n	Diese Arbeit
93-(2)		IMT2263	J	APEC	O5:H-	Huhn; KB; D		n/p	Diese Arbeit
		IMT5215	J	APEC	O5:H10	Huhn; KB; D		p/p	Diese Arbeit
115-(2)		IMT2098	J	APEC	O2:H9	Huhn; KB; D		n/p	Diese Arbeit
		IMT2294	J	APEC	O2:K1:H9	Huhn; KB; D		p/p	Diese Arbeit
38-(1)		IMT2111	J	APEC	O1:H15	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
57-(1)		IMT9250	N	APEC	O131:H25	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
100-(1)		IMT5110	J	APEC	O149:K91	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
162-(1)		IMT2095	J	APEC	O8:H19	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
350-(1)		IMT2264	J	APEC	O5:H-	Huhn; KB; D		n/n	Diese Arbeit
365-(1)		IMT5132	J	APEC	O88:H8	Pute; KB; D		n/n	Diese Arbeit

Andere-(27)

ST-Komplex-(n)	ST-(n)	Stamm	PFGE	Pathovar	Serotyp	Wirt; Erkrankung; Herkunft	neuCl/ kpsMT	Referenz
Andere-(27)	371-(1)	ECL1030	N	APEC	O45	Huhn; KB; Kan.	n/n	(Dozois <i>et al.</i> , 2000)
	373-(1)	IMT9712	N	APEC	O22	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
	374-(1)	IMT9179	N	UPEC	On.t.:H18	Hund; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
127-(4)	E817	NMEC	N	NMEC	O6:K2	Mensch; NBM; USA	n/n	(Dobrindt and Hacker, 2001)
	E247	NMEC	N	NMEC	O6:K15	Mensch; NBM; USA	n/n	(Dobrindt and Hacker, 2001)
	IMT6748	UPEC	N	UPEC	O6:K7:H-	Mensch; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
	IMT6747	UPEC	N	UPEC	O6:K14:H-	Mensch; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
141-(4)	B6993	UPEC	N	UPEC	O2:K1:H6	Mensch; UTI; D	p/p	(Dobrindt and Hacker, 2001)
	IMT8897	APEC	N	APEC	O2:K1	Sperling; KB; NL	p/p	Diese Arbeit
	IMT2477	APEC	J	APEC	O2:H6	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
	IMT5144	APEC	J	APEC	O2:K1:H-	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
70-(2)	C90 (EcoR 48)	UPEC	N	UPEC	On.t.:Hn.t.	Mensch; UTI; Swe	n/p	(Ochman and Selander, 1984)
	IMT2282	APEC	J	APEC	O23:H15	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
372-(2)	IMT9650	UPEC	N	UPEC	O83:H31	Hund; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
	IMT9713	APEC	N	APEC	O125:H10	Huhn; KB; D	p/p	Diese Arbeit
12-(2)	J96	UPEC	N	UPEC	O4:K6:H-	Mensch; UTI; USA	n/n	(Welch <i>et al.</i> , 2002)
	C89 (EcoR 60)	UPEC	N	UPEC	O4:HN	Mensch; UTI; Swe	n/n	(Ochman and Selander, 1984)
135-(2)	2363	APEC	N	APEC	O2:H1	Huhn; KB; USA	n/n	(Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005)
	IMT2295	APEC	J	APEC	O2	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
354-(2)	IMT7848	UPEC	N	UPEC	O153:H34	Mensch; UTI; Chi	n/n	Diese Arbeit
	IMT7808	UPEC	N	UPEC	O153:H34	Hund; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
92-(1)	536	UPEC	N	UPEC	O6:K15	Mensch; UTI; D	n/n	(Welch <i>et al.</i> , 2002)
131-(1)	B677-1	UPEC	N	UPEC	On.t.:H5	Mensch; UTI; D	n/n	(Dobrindt and Hacker, 2001)
362-(1)	B7001	UPEC	N	UPEC	On.t.:H-	Mensch; UTI; D	n/n	(Dobrindt and Hacker, 2001)
80-(1)	BK658	NMEC	N	NMEC	O75:K1:H7	Mensch; NBM; D	p/p	(Dobrindt and Hacker, 2001)
68-(1)	IMT9227	UPEC	N	UPEC	O153:H6	Katze; UTI; D	n/n	Diese Arbeit
118-(1)	IMT4537	APEC	J	APEC	On.t.:H-	Huhn; KB; D	n/n	Diese Arbeit
125-(1)	IMT2247	APEC	N	APEC	O21:H-	Sittich; KB; D	n/n	Diese Arbeit

**Außerhalb-
(34)**

ST-Komplex-(n)	ST-(n)	Stamm	PFGE	Pathovar	Serotyp	Wirt; Erkrankung; Herkunft	<i>kpsMT</i>	<i>neuC</i>	Referenz
	347-(1)	IMT2092	J	APEC	O88:H-	Huhn; KB; D	n/n		Diese Arbeit
	348-(1)	IMT2104	J	APEC	O2:H4	Huhn; KB; D	n/n		Diese Arbeit
	349-(1)	IMT2261	J	APEC	O166:H15	Huhn; KB; D	n/n		Diese Arbeit
Außerhalb-	352-(1)	IMT4514	J	APEC	O2:K1:H5	Huhn; KB; D	n/n		Diese Arbeit
(34)	357-(1)	IMT2121	J	APEC	O13:K1:H4	Pute; KB; D	p/p		Diese Arbeit
	358-(1)	IMT2248	N	APEC	O88:H5	Huhn; KB; D	p/p		Diese Arbeit
	363-(1)	IMT5119	J	APEC	O46:K1:H-	Huhn; KB; D	p/p		Diese Arbeit
	351-(1)	IMT2265	J	APEC	O18:H7	Huhn; KB; D	n/n		Diese Arbeit

In den beiden linken Spalten sind die Ergebnisse zu den STs und ST-Komplexe der MLST-Analyse; PFGE= Teil der PFGE Untersuchung; *neuC*/*kpsMT*= Angaben zum Vorkommen des Kl;

Abkürzungen: J= Ja ; N= Nein; An.: Anzahl der gefundenen Stämme; p= positiv; n= negativ; D= Deutschland; Kan.= Kanada; Swe= Schweden; Chi= Chile; NL= Niederlande; VC= Volksrepublik China; Bra= Brasilien; KB= Kolibakteriose; NBM= Neugeborenen-Meningitis; UTI= Urogenitaltraktinfektion; n.t.= nicht typisierbar; sp.= unspezifisch agglutiniert

Um einen Eindruck von der Phylogenie der *E. coli*-Erreger aus dem *Liquor cerebrospinalis* zu erhalten, wurden 15 unabhängig voneinander isolierte Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli* (NMEC) Stämme typisiert und im MSTree (blau) visualisiert (Abb. 3). Davon teilen acht den gleichen ST-Komplex mit den Isolaten von septikämischen Vögeln innerhalb des ST-Komplex 95. Dies ist ein starker Hinweis auf phylogenetische Verwandtschaft zwischen diesen Pathovaren. Sie besitzen die Oberflächen-Antigene O1 und O18 und schließen den Prototyp-Stamm RS218 mit ein (Kim, 2001). Vier andere NMEC-Stämme bilden den ST62 und tragen den O-Typ O7. Diese sind mit den anderen APEC und UPEC-Stämmen nicht verwandt. Zusätzlich gibt es drei Isolate (2xO6 und 1xO75), die nicht mit den vorherigen in phylogenetischer Verbindung sind. Die meisten NMEC gehören zum ST95, zu dem auch die meisten APEC gehören. Diese Ergebnisse sprechen für ein zoonotisches Potential. Allgemein kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass APEC im ST95 eventuell verantwortlich sind für klinische Fälle von Urogenitaltraktinfektionen und Meningitis. Da die neonatale Meningitis, verursacht durch *E. coli*, eine seltene Erkrankung ist und NMEC nur sporadisch isoliert werden, kann man zusätzlich zu den phylogenetischen Analysen annehmen, dass aviäre Stämme ein Reservoir für immer wiederkehrende pathogene Klone bilden, die Menschen infizieren können. Dies gilt aber nur für die gemeinsamen phylogenetischen Gruppen und nur für die durch diese Stämme ausgelösten klinischen Fälle. Darüber hinaus gehört ein hoher Anteil der typisierten Isolate zu STs, die nicht mit anderen in Verbindung stehen.

Die traditionelle Sicht der *E. coli*-Verwandtschaft bestätigt die Verteilung der ExPEC in unterschiedlichen Linien (Abb. 3). Während der ST95- und der ST-Komplex 73 aus B2-Stämmen bestehen, haben ST62 und ST117 ihren genetischen Ursprung in mehreren, unterschiedlichen Linien (ABD). Der ST-Komplex 23 hat seinen genetischen Ursprung in B1 und der nicht-pathogene Laborstamm MG1655 ist im Vergleich hierzu aus der Gruppe D.

Das Kapsel-Polysaccharid K1 spielt eine wichtige Rolle als protektiver Faktor, um die Immunantwort des Wirtes zu umgehen, und ist zusätzlich stark mit der Invasivität von *E. coli* korreliert. Diese Fähigkeit ist besonders wichtig für die Pathogenese extraintestinaler Infektionen. In dieser Arbeit wurde das Vorkommen dieses Virulenz-assoziierten Faktors mittels zweier PCR für unterschiedliche Gene (*neuC* und *kpsMTII*) detektiert (Tab. 5 und Tab. 6). Die Ergebnisse zu zwei Primerpaaren wurden herangezogen zur besseren Validierung der Gesamtaussage zum Kapseltyp. Die Konkordanz zwischen beiden PCR war 98%. In der Arbeit von Ewers *et al.* (2007) waren 92% der NMEC, 30,7% der APEC und 9,2% der UPEC K1-Träger. Bei den Stämmen dieser Arbeit sind 86,7% der NMEC, 35,8% der APEC und 6,7% der UPEC *neuC*-positiv.

Tab. 6: Verteilung der K1-Typen in bestimmten Clustern mit ExPEC-Stämmen

	ST-Kom- plex 95	ST-Kom- plex 73	ST-Kom- plex 23	ST117	ST62	außerhalb Cluster
K1-pos.	38 (97,4%)	0	0	0	4 (100%)	10 (16,7%)
konträr	0	0	0	0	0	3 (5%)
K1-neg.	1 (2,6%)	11 (100%)	25 (100%)	12 (100%)	0	47 (78,3%)

Das K1-Vorkommen wurde mit zwei PCRen bestimmt. Abweichende Ergebnisse zwischen der unterschiedlichen *neuC*-PCR und der *kpsMTII*-PCR sind als „konträr“ eingetragen.

Abb. 4: Verteilung der K1-positiven Stämme bei *E. coli*; UPEC innerhalb der EcoR

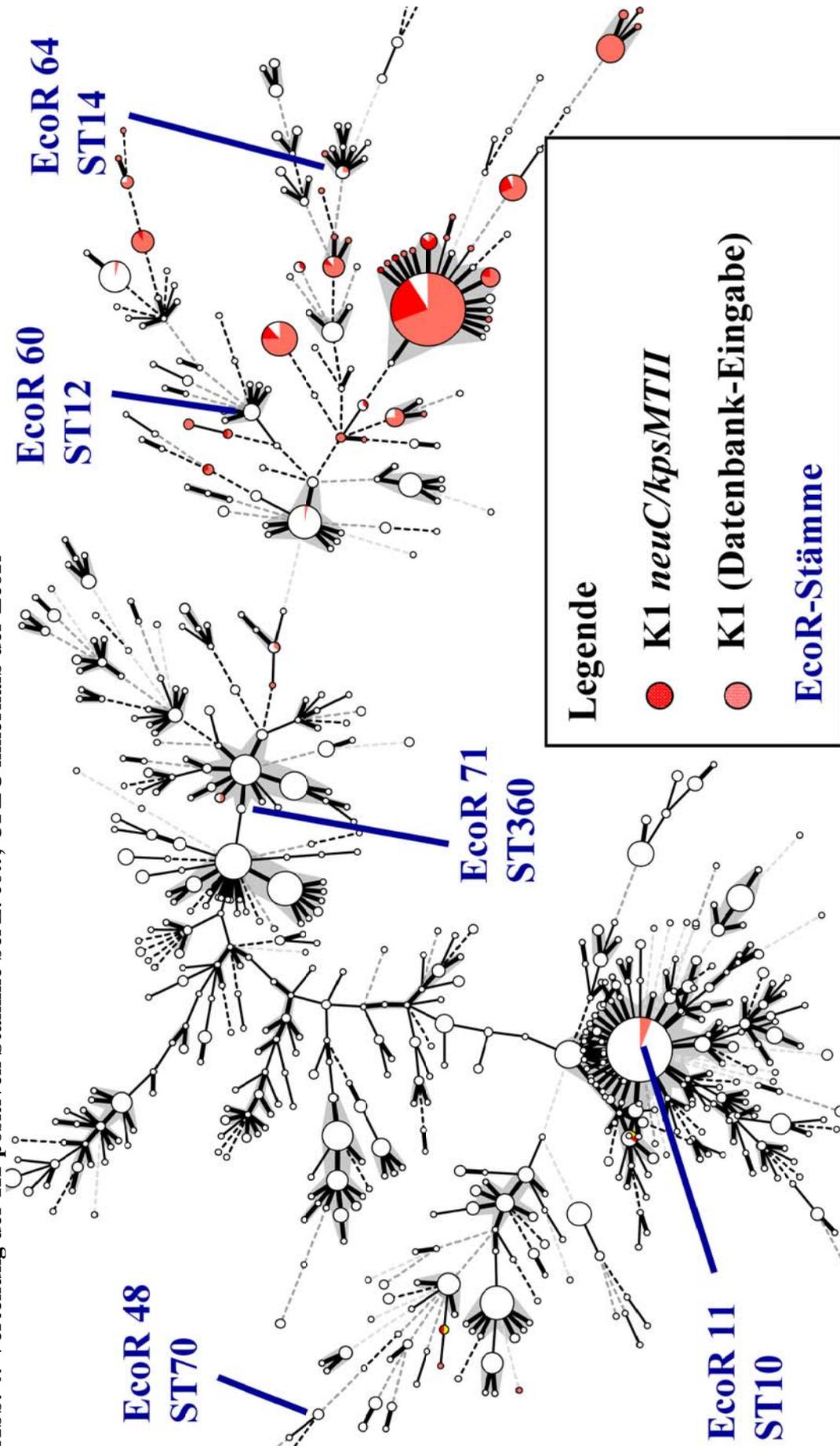


Abb. 4: Anzahl der Stämme aus der öffentlichen Datenbank= 1.588. Verteilung der EcoR-Stämme des Pathovar UPEC im MSTree (Kap.: 4.2)

Bei den phylogenetischen Ergebnissen der MLST zeigt das Vorkommen des K1 ein sehr klares Muster. Kein anderer Virulenz-assoziiertes Faktor ist so sehr auf bestimmte Gruppen begrenzt und somit hoch-konserviert. Die Stämme in ST-Komplex 95 und ST62 sind fast zu 100% K1-positiv, während der ST-Komplex 23, der ST-Komplex 73 und der ST117 komplett negativ sind. Einige Träger befinden sich auch außerhalb der Cluster (16,7%).

In der Darstellung im Verhältnis zur *E. coli*-Gesamtpopulation wird die ungleiche Verteilung dieses VFs deutlich (Abb. 4). Bestätigt werden die Ergebnisse aus den PCREn durch die Einträge in die öffentliche Datenbank. Das K1 ist somit hochkonserviert unter den ExPEC-Isolaten in bestimmten phylogenetischen Gruppen. Wahrscheinlich hat der Phänotyp dieses Virulenzmerkmals zur Entwicklung dieser Gruppen mit einer bedeutenden Anzahl von Erregern geführt. Der ST-Komplex 95 ist möglicherweise der bedeutendste und aus der mikroevolutionären Perspektive auch der, dessen Varianten sich am aktivsten fortentwickeln. Es haben sich im Gegensatz zu anderen STs eine Vielzahl von Single-Locus-Varianten (SLV) entwickelt mit Isolaten aus unterschiedlichen Pathovaren. 16,7% der 60 Isolate außerhalb der formulierten ExPEC-Cluster sind ebenfalls K1-positiv, was auf eine mögliche Streuung dieser Virulenzdeterminante in andere Gruppen hindeutet. Dies könnte eine regelmäßige Diffusion in andere phylogenetische Gruppen mit der Potenz zur Entwicklung neuer pathogener Klone sein oder sie stellen Reste alter evolutionärer Linien dar.

4.3 Phylogenetische Analysen bestätigen unabhängige Herkunft bei ExPEC

Wichtige Erkenntnisse der bakteriellen Phylogenie werden aus den Einzelnukleotid-Polymorphismen synonyme Punktmutationen in Haushalts-Genen gewonnen. Diese können durch die MLST in allen Stämmen detektiert werden und es wird angenommen, dass diese nur einer schwachen evolutionären Selektion unterliegen. Diese Daten kommen dem, was bekannt ist als molekulare Uhr, besonders nahe. Die Frequenz, mit der diese molekulare Uhr schlägt, wurde mehrmals geschätzt und Werte in einem Bereich zwischen 6×10^{-9} (Whittam, 1996) und 7.7×10^{-10} Mutationen pro Basenpaar pro Jahr (Wirth *et al.*, 2006) wurden angegeben.

Die letztgenannte Arbeit von Wirth *et al.* (2006) zeigt auch gleichzeitig die Limitierung solcher Konzepte, da die Evolutionsraten sich in bestimmten pathogenen Linien ändern können und die molekulare Uhr somit falsch bestimmt wird und die Entfernung zwischen den phylogenetischen Gruppen verwischt wird. Nichtsdestotrotz ist dieses Grundkonzept geeignet zur Veranschaulichung der unabhängigen Evolution unterschiedlicher Gruppen innerhalb der Gesamtpopulation von *E. coli*. Dasselbe Verfahren wurde auch schon für die Entwicklung von *Salmonella enterica enterica* Serovar Typhi innerhalb von *Salmonella spp.* angewandt (Kidgell *et al.*, 2002).

In der Analyse wurde für den prominenten ExPEC-Cluster im ST95 ein letzter gemeinsamer Vorfahre (time of last common ancestor) jeweils mit den ST23, ST62 und ST117 vor ungefähr 20 Millionen Jahren errechnet. ST95 und ST73 sind näher verwandt und haben sich vor 5,1 Millionen Jahren aufgeteilt. Aus der Abb. 5 ist zu erkennen, wie diese Ergebnisse aus den Analysen sich in den Entfernungen im MSTree widerspiegeln. Beide Methoden werden dadurch validiert.

Abb. 5: Zeitpunkt des letzten gemeinsamen Vorfahren zwischen den ExPEC-Clustern

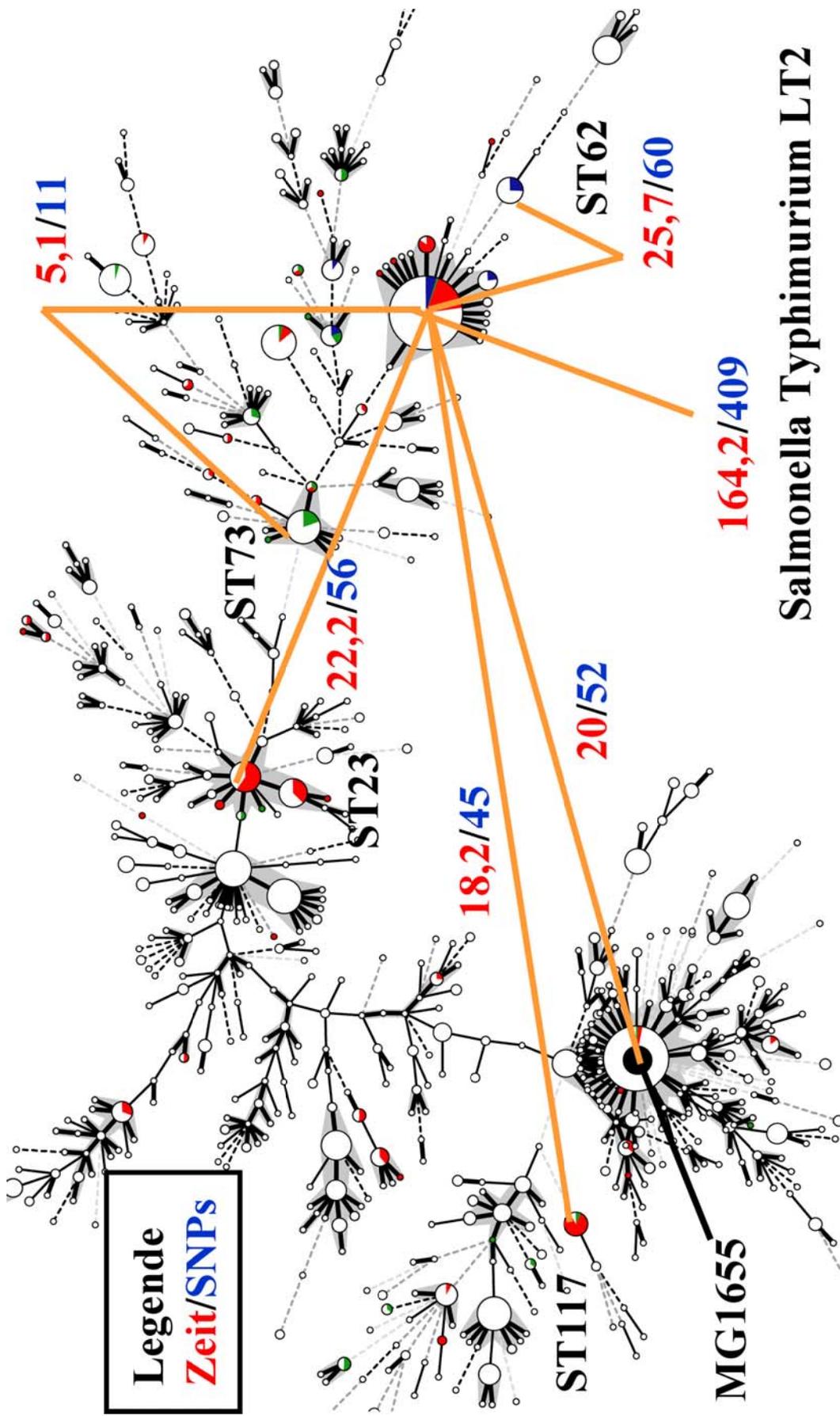


Abb 5: Die errechnete Zeit in Millionen Jahren (rot) ist die unabhängige Entwicklungszeit zwischen den STs (orange) und gibt den Zeitraum des letzten gemeinsamen Vorfahren an. Zusätzlich ist noch die Anzahl der unterscheidenden Nukleotide in synonymen polymorphen Stellen der sieben Haushalts-Gene (blau) angegeben. Anzahl der Stämme aus der öffentlichen Datenbank= 1.588.

Diese Analyse unterstützt die Aussage, dass phylogenetische Gruppen von *E. coli* sich unabhängig voneinander aus der Gesamtpopulation entwickelt haben. Sie teilen sich aber die gleichen ExPEC-spezifischen Virulenz-assoziierten Faktoren und lösen, jeweils spezifisch für jedes Pathovar, die gleiche Krankheit bei Tieren und Menschen aus. Da die evolutionäre Herkunft der bakteriellen Träger unabhängig ist, können sie auch grundsätzlich parallel zueinander unterschiedliche Pathogenese-Mechanismen entwickelt haben. Das gleiche gilt für ihre Spezifität zu Wirt und Umgebung.

In der Literatur zur Phylogenie bei *E. coli* werden Rekombinationsraten abhängig von der angewandten Methode als niedrig (Selander and Levin, 1980), variabel je nach phylogenetischer Gruppe (Wirth *et al.*, 2006) oder hoch (Guttman and Dykhuizen, 1994) berichtet. Ein schlichter aber grundlegender Blick auf das Vorkommen unterschiedlicher Alleltypen der sieben Haushalts-Gene gibt einen Eindruck auf den Einfluss von horizontalem Genaustausch bei den Isolaten dieser Studie (Tab. 7).

Tab. 7: Vorkommen bestimmter Allele in STs und ST-Komplexen mit ExPEC

Gruppe	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
ST-Komplex 95	37, 55	38, 102, 110	19, 45, 86, 89	37, 51	17, 72, 95	8, 11, 13, 100	26
ST-Komplex 73	13, 36, 76	24	9	13	17, 26	5, 11	14, 25, 68
ST-Komplex 23	6, 56	4, 97, 101	12, 33	1	5, 11, 20	7, 8, 12, 13, 18	7
ST117	20	45	41	43	5	32	2
ST62	28	33	25	29	7	11	24

Vergleich der sieben Alleltypen der wichtigsten ExPEC ST-Komplexe zur Detektion von gleichen Typen und damit von möglichem horizontalem Genaustausch. **Fett:** Alleltypen des Primär-Genotypen „Founding genotype“, die am häufigsten in dem jeweiligen ST-Komplex gefunden wurden; **Grau:** Allel-Typen, die parallel in mehreren ExPEC-Clustern gefunden wurden. Stand: Oktober 2008

Die Allele der sieben Haushalts-Gene bei den ExPEC-spezifischen Gruppen sind nicht zufällig verteilt (=hohes linkage disequilibrium). Die meisten sind spezifisch für eine bestimmte Gruppe. Dies gilt für alle verglichenen Gruppen und alle sieben Gene mit zwei Ausnahmen auf die noch eingegangen wird. Die Analyse innerhalb der sieben Gene deutet

darauf hin, dass ein Austausch von genetischem Material zwischen den Gruppen unbedeutend ist. Der horizontale Genaustausch zwischen den Gruppen reicht somit nicht aus, um ein klares Bild von der Verwandtschaft zwischen den Gruppen zu verwischen und somit unbewusst ein falsches Bild von den phylogenetischen Zusammenhängen zu vermitteln.

Außerdem zeigt sich, dass sich die verwandten phylogenetischen Gruppen ST-Komplex 95 und ST-Komplex 73 die Allele *mdh*-Typ 17 und *purA*-Typ 11 im Primär-Genotyp teilen. Dies kann teilweise durch den hohen Verwandtschaftsgrad dieser beiden ST-Komplexe, die schon in vorherigen Analysen mittels MSTree hervortrat (Abb. 3), erklärt werden, so dass diese Allele nicht genug Zeit hatten, um sich parallel weiterzuentwickeln. Als Alternativhypothese kann aber Rekombination zwischen den phylogenetischen Gruppen als Grund auch nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann man noch eine interessante Beobachtung zwischen dem ST-Komplex 95 und dem ST62 machen. Diese STs unterscheiden sich in 60 Basenpaaren (bp) von 3.423 bp (Abb. 5) und können damit als wenig verwandt angesehen werden. Das *purA*-Allel ist davon aber unbetroffen und sie teilen sich den gemeinsamen *purA*-Typ 11. Wie aus Tab. 6 ersichtlich sind beide STs stark assoziiert mit dem Faktor K1 (Kap. 4.2). Ob beide genetischen Faktoren (K1 und *purA*) zufällig und unabhängig voneinander bei ExPEC ausgetauscht wurden, oder ob sie sich gleichzeitig und parallel entwickelten, muss durch nähere molekularbiologische Analysen des Kapseltyps herausgefunden werden.

Alle phylogenetischen Analysen deuten darauf hin, dass es unabhängige Gruppen bei ExPEC gibt. Sie haben ihre individuellen Ursprünge in der *E. coli*-Gesamtpopulation. Sie sind trotzdem in der Lage gleiche oder wenigstens ähnliche klinische Erkrankungen auszulösen.

4.4 Ungleiche Verteilung der Virulenz-assoziierten Faktoren zwischen den Stämmen

Die Einteilung der ExPEC in die drei Pathovaren erfolgt durch Kriterien der Anamnese wie Wirtstyp (human < > tierisch) oder Ursprungsorgan (Hirnhaut < > Blase). Sie ist unabhängig von dem Vorkommen von Virulenz-assoziierten Faktoren (VF). Diese Virulenzdeterminanten sind charakterisiert durch hohe Mobilität und die Fähigkeit zu horizontalem Gentransfer, durch den einige phylogenetische Gruppen in der Lage sind, neue Eigenschaften zu erwerben (Dobrindt *et al.*, 2003). Zusätzlich kann DNS-Material auch verkürzt werden (Reduktive Evolution). Im Allgemeinen sind VFs wichtig für die Fitness einzelner Linien und unterliegen somit hohem evolutionärem Selektionsdruck. Eindeutige und klare Muster bei der Prävalenz dieser Gene im Zusammenhang mit der Phylogenie über eine lange Zeit können nicht erwartet werden. Umso überraschender ist es, dass man im Falle des K1 eine klare phylogenetische Assoziation erkennen kann (Kap. 4.2).

Für eine quantitative Betrachtung über mehrere VFs ist aus den untersuchten Genen von Ewers *et al.* (2007) (Tab. 3), die unter anderem für die gleichen Stämme bestimmt wurde, ein Virulenzindex gebildet worden. Die APEC-Stämme innerhalb der Cluster (ST-Komplex 95, ST-Komplex 23 und ST117) beherbergen signifikant mehr VFs als die Stämme außerhalb der Cluster (Tab. 8). Diese Erscheinung ist besonders auffällig im ST-Komplex 95 mit durchschnittlich 19,8 VFs (Odds ratio (OR)= 2,48) und im ST117 mit 16,1 VFs (OR= 1,5) gegenüber nur 12,9 in der verstreuten APEC außerhalb der Cluster. Im ST-Komplex 23 ist dieser Effekt weniger ausgebildet mit 13,9 (OR =1,2) gegenüber 12,9 außerhalb. Ähnliches gilt für UPEC im ST-Komplex 73 und außerhalb (18,13 versus 13,8 VFs; OR= 1,75) und in NMEC ST-Komplex 95 (18,3 versus 14 VFs; OR= 1,74).

In dieser Analyse wurden Gruppen pathogener ExPEC entdeckt, die in der Lage sind vermehrt VFs zu akquirieren als Stämme in anderen Linien. Deshalb besetzen sie andere

Nischen und sind, was ihre Virulenz betrifft, erfolgreicher und damit auffälliger für den Kliniker und Diagnostiker. Diese „potenteren“ phylogenetischen Linien von *E. coli*, die die aviäre Kolibakteriose, Urogenitalinfektionen und/oder die neonatale Meningitis auslösen, können zu einer neuen Definition dieser Pathovaren nach ihren Sequenztypen führen. Es könnte somit zwischen hochpathogenen und minderpathogenen APEC unterschieden werden. Dies kann zu einer neuen Definition des Pathovars beitragen, als allein über den medizinischen Ursprung der Stämme.

Tab. 8: Virulenzindex für die Pathovaren und Genotypen in dieser Arbeit

Gruppe	Anzahl	Pos.	Neg.	Mittel (Index)	OR	Unteres KI	Oberes KI
alle Stämme	151	2.334		15,46			
alle APEC	106	1.642		15,49			
im ST-Komplex 95	30	594	336	19,8	2,48	2,09	2,94
im ST-Komplex 23	23	329	384	14,3	1,2	1,0	1,44
im ST117	11	177	164	16,09	1,51	1,19	1,92
außerhalb ST-Komplex	42	542	760	12,9			
alle UPEC	30	449	480	15			
im ST-Komplex 73	8	145	103	18,13	1,75	1,3	2,35
außerhalb ST-Komplex	22	304	378	13,82			
alle NMEC	15	242	223	16,13			
im ST-Komplex 95	8	146	102	18,25	1,74	1,08	2,81
im ST62	4	49	75	12,25	0,79*	0,46*	1,37
außerhalb ST-Komplex	3	42	51	14			

OR= Odds Ratio über die Anzahl der VFs bei den Stämmen innerhalb des jeweiligen ST-Komplexes gegenüber den Stämmen außerhalb der ST-Komplexe; Odds ratios sind angegeben mit unterem und oberem Konfidenzintervall (KI). Bei einem OR und einer unteren Konfidenzgröße kleiner als 1 (*) wird der Test als „Alternativhypothese nicht bestätigt“ angesehen. Pos.= Summe aller positiv-getesteten VFs; Neg.= Summe der negativ-getesteten VFs; Mittel= arithmetisches Mittel über die Anzahl der positiv-getesteten VFs pro Stamm

4.5 Unterschiedliche Serotypen in den gleichen Sequenztypen bei APEC

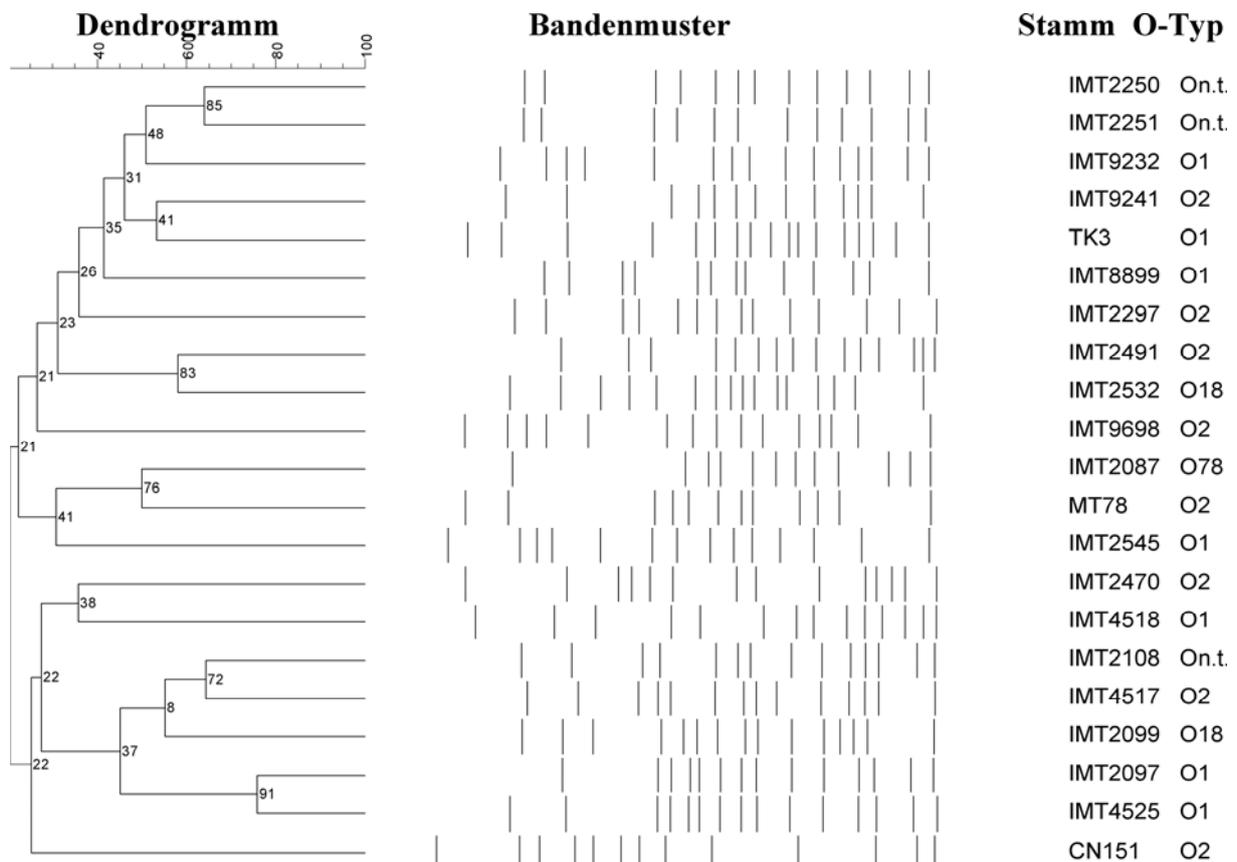
Serologische Typisierungsmethoden haben eine lange Tradition in der Mikrobiologie und die APEC-Stämme in dieser Arbeit wurden auch zu Gruppen von O-, K-, H-Typen zugeordnet. Während die H-Typen und die K-Typen -mit Ausnahme des K1- nicht näher betrachtet werden, sollen hier anhand der O-Typen einige Probleme in Hinblick zur Konkordanz mit phylogenetischen Untersuchungen präsentiert werden (Tab. 5). Der ST-Komplex 95 ist assoziiert mit den O-Typen O1 und O2, enthält aber auch O18-, O76- und O78-Stämme. Der ST-Komplex 23 schließt am meisten O78-Stämme ein mit Ausnahme je eines O2, O9 und O160. Die APEC, die im phylogenetisch besonderen ST117 klassifiziert wurden, tragen unterschiedliche O-Typen (2 x O2, 3 x O24, 2 x O78, 1 x O101 und 1 x O161). Dieser

Mangel an Konkordanz zur MLST kann nicht alleine durch die niedrigere Diskriminierungsfähigkeit der sequenzbasierten Methode erklärt werden. Es sind derzeit 181 unterschiedliche O-Typen in *Escherichia coli* definiert, aber momentan schon über 800 unterschiedliche Sequenztypen (Oktober 2008), was auf eine höhere Diskriminierungsfähigkeit der MLST zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einige O-Typen in *E. coli* polyphyletisch sind. In der öffentlich zugänglichen und umfangreicheren MLST-Datenbank ist zusätzlich zu erkennen, dass dies nicht für alle Serotypen gilt. Im Diskussionsteil dieser Arbeit wird darauf näher eingegangen.

4.6 Vergleich der bandenbasierten- und nukleotidbasierten Subtypisierung

Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine bakterielle Typisierungsmethode und wurde auch für *Escherichia coli* vielfach für die Untersuchung von epidemiologischen Ausbrüchen als auch für phylogenetische Klassifizierungen benutzt. Dabei werden für jeden Stamm durch mehrmalige Spaltung des bakteriellen Genoms an unterschiedlichen Stellen charakteristische Bandenmuster produziert, die später visuell verglichen werden können. Zusätzlich können durch die Anwendung des Clusteralgorithmus Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) eine Gruppe von Stämmen in einem Dendrogramm dargestellt werden. Parallel zur Arbeit mit der nukleotidbasierten Methode MLST wurden im Laufe dieser Arbeit viele Stämme auch mit der bandenbasierten Methode PFGE untersucht.

Abb. 6: PFGE-Makrorestriktionsanalyse innerhalb des ST95



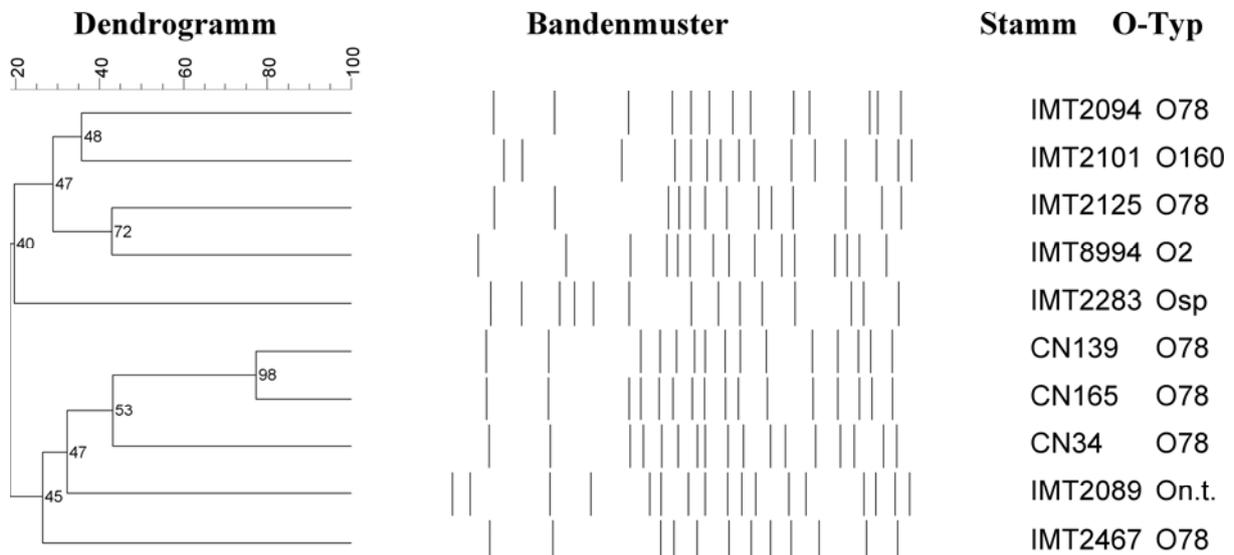
21 APEC-Stämme aus dem ST95; Links: UPGMA-Dendrogramm mit entsprechenden Bootstrap-Werten und Ähnlichkeitsskala in %; Mitte: Bandenmuster; Rechts: Stammbezeichnung und O-Typ

Bei einer phylogenetischen Charakterisierung von APEC-Isolaten mittels MLST wurden 38 unterschiedliche STs gefunden (Kap. 4.1). Die STs mit dem höchsten Vorkommen waren der ST95 mit 21 Stämmen und der ST23 mit 13 Stämmen. Um das Verhältnis zwischen PFGE und den einzelnen Sequenztypen näher zu beleuchten, wurden die PFGE-Bandenmuster der Stämme in diesen beiden STs untersucht (Abb. 6 und Abb. 7). Ein allgemeiner Blick auf beide Dendrogramme lässt erkennen, dass innerhalb eines STs eine Vielzahl von Klonen vorkommen. Die interne Übereinstimmung der PFGE-Muster dieser Klone innerhalb des gleichen Sequenztyps ist aber gering. Eine Formulierung von Clustern und Subclustern aufgrund hoher Ähnlichkeitswerte und Bootstrap-Werte ist nicht möglich.

Innerhalb der 21 ST95-Stämme zeigten sich in der Makrorestriktion unterschiedliche Bandenmuster. Nur wenige Isolate zeigen in der Analyse hohe Ähnlichkeit mit gleichzeitig hoher Unterstützung bei den Bootstrap-Werten (z.B.: IMT2097 und IMT4525). Die meisten Isolate zeigen eine hohe Variabilität bei den PFGE-Bandenmustern. Ihre Werte für die Ähnlichkeit liegen unterhalb 80% und die Bootstrap-Werte unterhalb von 70%.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die 10 ST23-Stämme mit niedrigen Ähnlichkeiten und niedrigen Bootstrap-Werten. Eine Ausnahme bilden hier die Stämme CN139 und CN165 mit einer sehr hohen Ähnlichkeit im Dendrogramm. Die häufig zitierte hohe Diskriminationsfähigkeit der PFGE gegenüber anderen Methoden kann insgesamt durch diese Analyse bestätigt werden. Mit denselben Stämmen wurde PFGE mit dem Restriktionsenzym *NotI* durchgeführt (Daten nicht präsentiert). Durch die Anwendung eines anderen Restriktionsenzym wurden andere Gruppen gebildet. Das grundsätzliche Verhältnis von MLST und PFGE innerhalb dieser Gruppe von Stämmen stellt sich aber als gleich dar.

Abb. 7: PFGE-Makrorestriktionsanalyse innerhalb des ST23



10 APEC-Stämme im ST23. Links: UPGMA-Dendrogramm mit entsprechenden Bootstrap-Werten und Ähnlichkeitsskala in %; Mitte: Bandenmuster; Rechts: Stammbezeichnung und O-Typ. Drei Stämme des ST23 ließen sich durch das Restriktionsenzym nicht korrekt schneiden und es konnte somit keine Makrorestriktion-Analyse durchgeführt werden

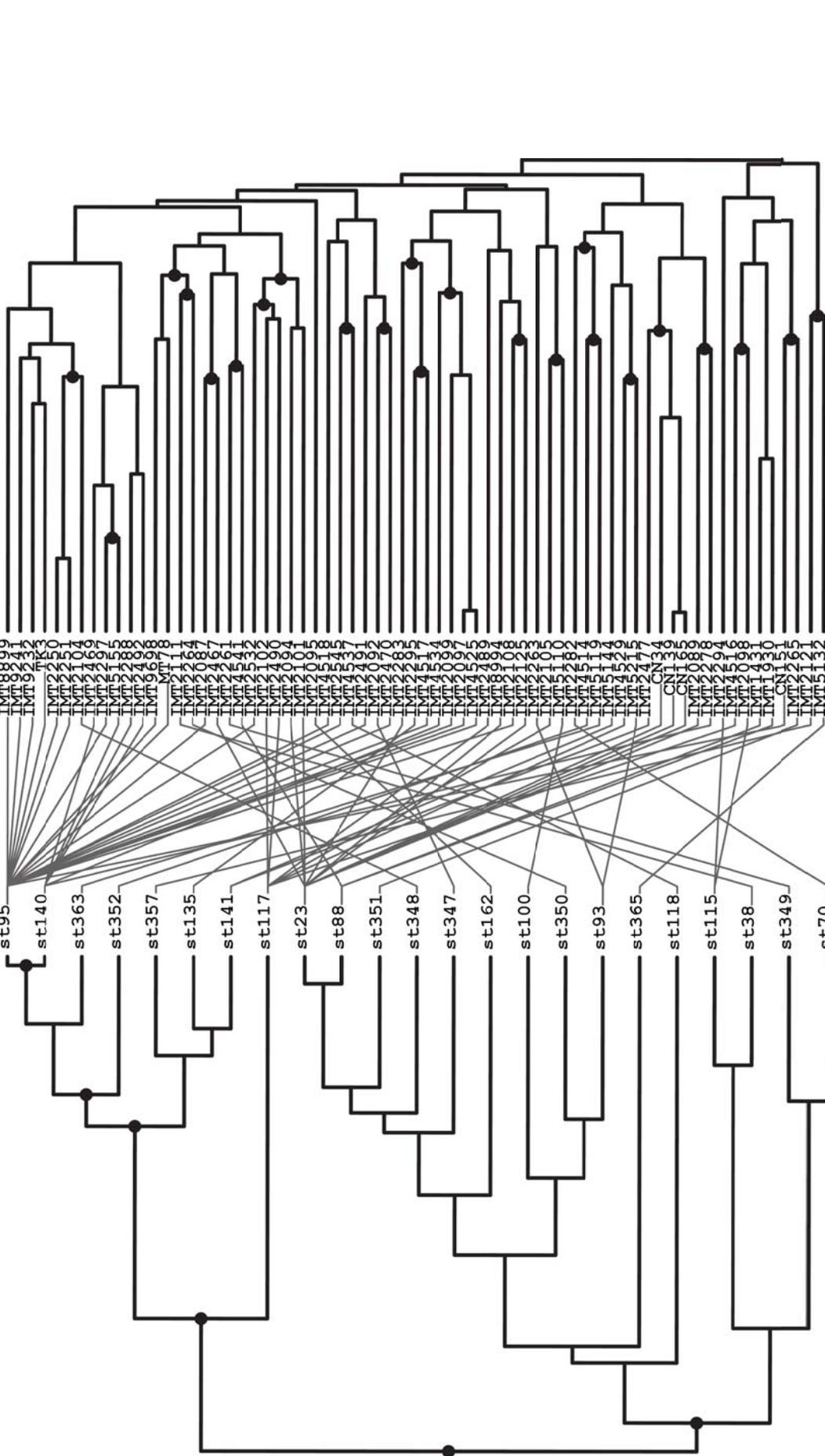
Allgemein kann man sagen, dass Isolate, die durch MLST in der gleichen phylogenetischen Gruppe klassifiziert sind, sich in der Makrorestriktion sehr unterschiedlich gruppieren. Die niedrigen Bootstrap-Werte zeigen, dass die Informationsbasis aus den PFGE-Bandenmustern

zu ungenau ist, um eine fundierte und stabile Verwandtschaftsanalyse herzustellen. Besonders deutlich wird dieses für Stämme innerhalb eines STs der MLST. Die Makrorestriktion ist somit nicht in der Lage, ein konsistentes Datensystem für ein Clustering der APEC-Isolate herzustellen.

Da diese Form des Vergleichs nur auf je ein ST beschränkt ist, kam nach den ersten Analysen der Wunsch auf, Stämme aus mehreren STs parallel mit beiden Methoden zu untersuchen, um somit Hinweise auf eine generelle Kongruenz zu erlangen. Dies stellt eine große Herausforderung für die Informationsverarbeitung dar, da zwei Dendrogramme parallelisiert werden müssen.

Eine interessante Lösung bietet die Software TreeMap, mit der man zwei Clustering-Bäume visuell in einem Tanglegram synchronisieren kann. Dies wurde mit 67 APEC-Stämmen innerhalb von 23 STs gemacht (Abb. 8). Dieses Vorgehen detektiert Teile, in denen die Typisierung und Clusterbildung von Stämmen nicht kongruent sind. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass viele Verbindungslinien quer laufend und schräg sind. Die Parallelität zwischen beiden Bäumen kann generell als niedrig bezeichnet werden. ST95- und die verwandten ST140-Isolate, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden, wurden in unterschiedlichen Teilen des PFGE-Baumes gefunden. Die Anordnung der unterschiedlichen Subcluster bei beiden Methoden variiert. Die Bandenmuster der ST23- und ST88-Stämme überschneiden sich in mehreren Fällen mit denen von ST95 und ST140. Diese beiden phylogenetischen Gruppen sind somit nicht unterscheidbar. Sie sind in der *E. coli*-Gesamtpopulation in Abb. 5 dargestellt und unterscheiden sich in 56 Nukleotiden von 3.423 Basenpaaren in Haushalts-Genen (1,6%). Das Vorkommen von gleichen Allel-Typen ist auf den *purA*-Typ 8 und *purA*-Typ 13 beschränkt. Insgesamt wird dieser massive Unterschied von den wenigen Restriktionsstellen in der PFGE nicht widerspiegelt. Beide Bäume enthüllen zwei komplett unterschiedliche Verwandtschaften zwischen den Untersuchungsstämmen. Sie sind inkongruent. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass PFGE-Banden bei *E. coli* eventuell falsche Verbindungen präsentieren, da MLST-Sequenzanalysen bewiesen haben, dass sie mit unterschiedlichen Algorithmen verlässliche und wiederholbare Ergebnisse liefern. PFGE bildet keine fundierte Basis für phylogenetische und epidemiologische Analysen bei einer größeren Anzahl von Stämmen, die nicht in einem engen epidemiologischen Zusammenhang stehen.

Abb. 8: Tanglegram; Basenbasierte Methode (MLST) kontra bandenbasierte Methode (PFGE)



Links sind die STs als Ergebnisse der MLST. Diese sind verbunden mit den Stämmen und dem Dendrogramm aus der PFGE (Rechts).

5 Diskussion

5.1 Neue Einsichten in die Mikroevolution der APEC

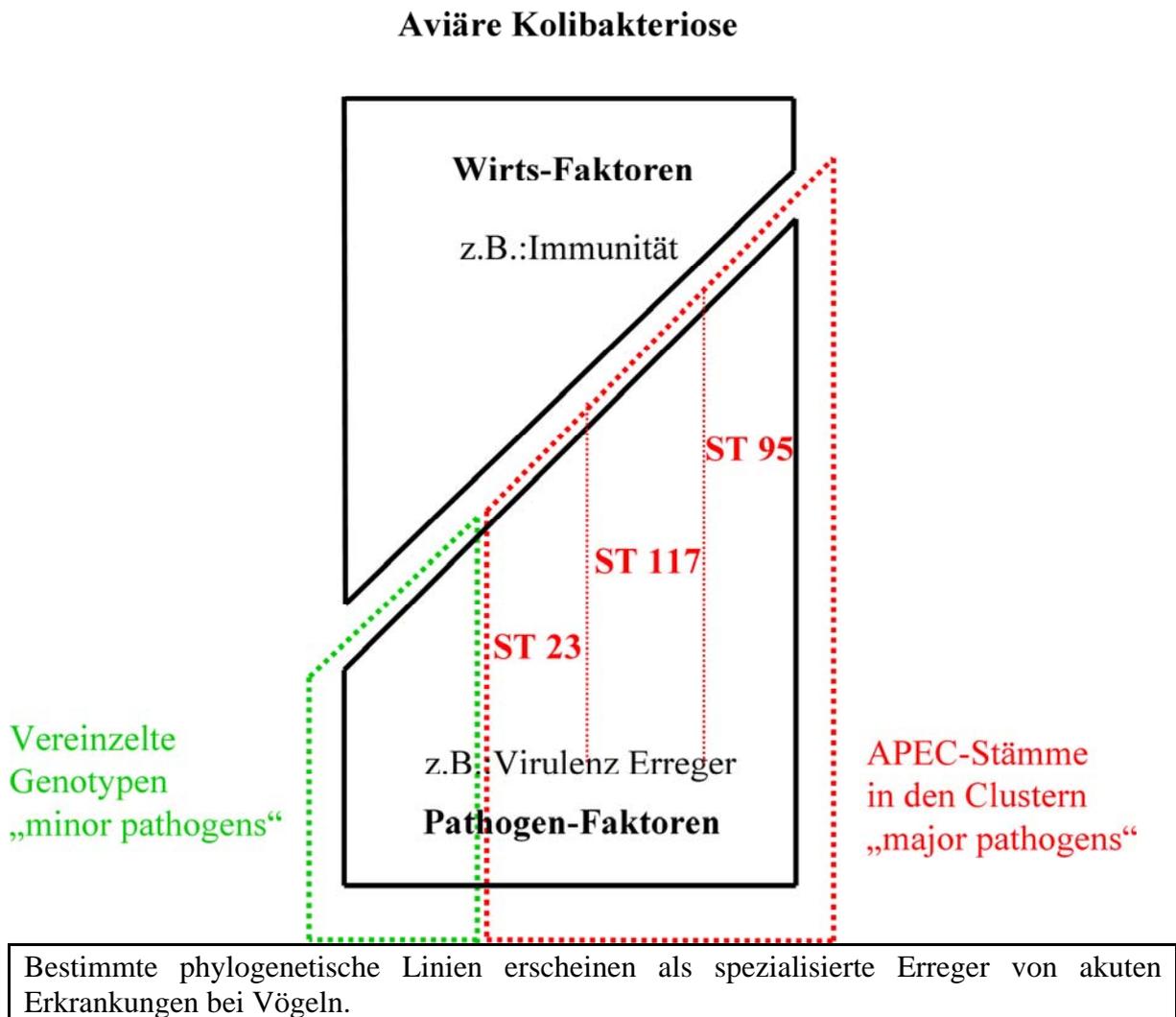
Mikroevolution im Sinne dieser Arbeit ist das Vorkommen von genetischen Unterschieden und Veränderungen innerhalb einer bakteriellen Spezies, die z.B. durch bevorzugte Auslese ausgelöst wurden und zur Entstehung von spezialisierten Untergruppen geführt haben. Mittels Multilocus Sequence-Typing (MLST) können diese Untergruppen detektiert werden. Die Populationsstruktur der aviären pathogenen *E. coli* (APEC) wird in Abb. 3 visuell dargestellt. Mit der großen Anzahl der Untersuchungsstämme in dieser Arbeit wurde versucht, das Maximum an diesen Untergruppen abzubilden, um den gesamten Umfang an Isolaten, die aviäre Kolibakteriose auslösen können, zu erfassen. Bei der Auswahl der Untersuchungsstämme wurde sich vor allem an den anamnestischen Vorbericht gehalten, um zeitlich und räumlich unterschiedliche Isolate selektieren zu können. Durch diese Methode bei der Stammaswahl kann man grundsätzlich annehmen, dass Stämme außerhalb der formulierten Cluster mit APEC bevorzugt selektiert wurden, da sie aufgrund ihres Vorberichts eine größere Wahrscheinlichkeit hatten in die Stammaswahl aufgenommen zu werden. Durch die angenommene Bevorzugung der phylogenetischen vereinzelt Genotypen unter den APEC ist es wahrscheinlich, dass die Fallzahlen der Kolibakteriose, ausgelöst durch die Stämme im ST-Komplex 95, ST-Komplex 23 und ST117, sind eigentlich viel höher als sie in der Stammaswahl repräsentiert werden. Eine volle Querschnittsstudie an Kolibakteriose-Fällen über einen definierten Zeitraum und Studienraum inklusive Randomisierung könnte in Zukunft ein klareres Bild über den Anteil der präsentierten Cluster an den klinischen Fällen bieten und die Wichtigkeit dieser phylogenetischen Gruppen unterstreichen. Zusätzlich zu der schon beschriebenen Akkumulation von APEC in bestimmten Cluster treten unabhängige und verstreute Genotypen dieses Pathovars als Einzelgänger im Minimum Spanning-Tree (MSTree) auf und sind verwandt mit kommensalen Isolaten als auch mit Stämmen von Pathovaren, die intestinale Erreger sind (Abb. 3). Daraus lässt sich folgern, dass die Entwicklung von pathogenen APEC-Stämmen nicht auf wenige Linien beschränkt ist und unabhängig voneinander mehrere Male und auf unterschiedliche Weise innerhalb der Population von *E. coli* stattgefunden hat. Die Detektion von mehreren phylogenetischen Linien innerhalb eines Pathovars wurde auch bei EPEC (Afset *et al.*, 2008) und bei EHEC (Mellmann *et al.*, 2008) mittels MLST-Analysen bestätigt. Die Verwandtschaft von APEC-Isolaten zu kommensalen Stämmen bei Vögeln ist nicht Teil dieser Arbeit, ist aber sicherlich eine weitere wichtige Fragestellung. In einer MLST-Studie mit *E. coli*-Stämmen aus der Blase von Patienten ohne klinische Erkrankung mit denen von Patienten mit Zystitis fiel deren hoher Grad an Verwandtschaft auf (Zdziarski *et al.*, 2008). Ob ähnliches auch auf die aviäre Kolibakteriose und fäkalen Isolaten zutrifft, muss herausgefunden werden.

In unterschiedlichen Studien und diversen Tierversuchen sind Virulenz-assoziierten Gene als Faktoren bei APEC erkannt worden, die es den Stämmen ermöglichen, innerhalb der Pathogenese spezifische Gewebe zu besiedeln und ihren Wirt zu schädigen (Dozois *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Mellata *et al.*, 2003). Diese Virulenz-assoziierten Faktoren (VF) sind nicht gleichmäßig über alle gefundenen phylogenetischen Linien verteilt (Ewers *et al.*, 2004a; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007). Aus dieser Arbeit geht hervor, dass einige Sequenztypen bei den ExPEC in der Lage sind mehr dieser Faktoren zu akkumulieren als andere. Dies trifft im besonderen Maße auf die Stämme innerhalb der ST-Komplex 95, ST-Komplex 73 und des ST117 zu (Tab. 8). Die schon beschriebenen vereinzelt Genotypen tragen weniger VF. Aufgrund der Tatsachen, dass die STs innerhalb der Cluster deutlich mehr dieser Gene tragen und Stämme aus unterschiedlichen Kontinenten und aus unterschiedlichen Jahren beinhalten, sieht der Autor die Isolate als APEC und UPEC „im engeren Sinne“ an. Es gibt somit

phylogenetische Linien, die vermehrt in der Lage sind, hochpathogene ExPEC-Stämme hervorzubringen. Diese Eigenschaft ist nicht gleichmäßig über alle Gruppen bei *E. coli* verteilt. In Zukunft bietet die Detektion dieser Stämme –innerhalb der bakteriellen Routinediagnostik- vielleicht eine Möglichkeit für eine verbesserte Diagnostik und Prophylaxe.

Unabhängig von der Definition des „wahren“ Pathogens der APEC gibt diese Verteilung Hinweise darauf, dass pathogene Stämme nicht zufällig durch den horizontalen Erwerb von krankmachenden Eigenschaften durch sonst opportunistische Erreger und Kommensalen entstehen (Dobrindt and Hacker, 2001). Hier sind bestimmte phylogenetische Gruppen in der Lage, ihre Virulenz durch genetischen Austausch immer wiederkehrend zu steigern. Sie stellen das hauptsächliche Risiko für die Entwicklung von Pathogenität dar und sind somit nun aufgrund ihrer Phylogenie diagnostizierbar. Im Gegensatz dazu können die anderen Stämme als Einzeltäter angesehen werden. Möglicherweise sind sie auch Relikte älterer phylogenetischer Gruppen mit pathogenen Stämmen.

Abb. 9: Modell zur aviären Kolibakteriose



Da die Evolution jedes Erregers immer auch im Hintergrund des Wirtes und seiner Umwelt betrachtet werden muss, kann man annehmen, dass diese Isolate sich eventuell mehr einer

kommensalen Lebensart angepasst haben und nur die Interaktion mit einem immun-komprimierten Wirt diesen niedrig-virulenten Stämmen die Gelegenheit gibt, einen vollen Infektionsprozess auszuführen. Sie wären dann im Gegensatz zu den anderen APEC, die nicht geclusterten „minor pathogens“ (Abb. 9).

Diese Hypothese könnte auch für uropathogene *E. coli* (UPEC) und Neugeborenen-Meningitis-assoziierte *E. coli* (NMEC) gelten, da dieselben Beobachtungen auch bei diesen Pathovaren darauf hindeuten (Abb. 3 und Tab. 8). Die Anzahl an Stämmen ist aber zu gering, um dieses tiefgehend darzustellen. Bei NMEC wird in einer vorherigen Studie ähnliches berichtet. Hochrisikogruppen mit Neugeborenen-Meningitis haben ein anderes phylogenetisches Profil an NMEC als Patienten mit niedrigem oder normalem Risiko (Bingen *et al.*, 1998; Tullus *et al.*, 1992). Während bei Patienten, die nicht Teil eines speziellen Risiko-Kollektiv waren, Stämme von phylogenetischen Typ B2 (80%) vornehmlich Auslöser der Meningitis waren, sind bei Hochrisikopatienten weniger Stämme aus B2 (37,5%) als auch aus A (50%) gefunden worden.

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit erstmals mehrere unterschiedliche geclusterte Phylotypen bei APEC, UPEC und NMEC entdeckt wurden, die in der Lage sind die gleiche Krankheit auszulösen führt zu der interessanten Frage: Warum koexistieren diese Systeme und warum verdrängen sie sich nicht, falls Sie die gleiche ökologische Nische besetzen? Eine Erklärung ist, dass sie ganz unterschiedliche Strategien haben, die zur Ausbildung einer Krankheit führen, die von den Klinikern nicht unterschieden werden, aber auf unterschiedlichen Pathogenese-Mechanismen beruhen. In einer intensiven Untersuchung mit der Microarray-Technik konnte herausgefunden werden, dass K1-Stämme aus dem *Liquor cerebrospinalis* von Meningitis-Patienten in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können (Yao *et al.*, 2006). Offene Leserahmen (ORF) von Genen unterschiedlicher Sekretionssysteme wurden in jeder Gruppe gefunden. Dies betont die Wichtigkeit des Verständnisses der bakteriellen Mikroevolution für tiefere Untersuchungen in der medizinischen Mikrobiologie anstelle des Vertrauens auf die einfache Identifikation von Virulenz-assoziierten Faktoren.

Die Biodiversität mikrobieller Spezies wird bestimmt durch das Habitat des Isolates im besiedelten Körper, als auch durch die geographischen Herkunft (Martiny *et al.*, 2006). Daraus ergibt sich der Grad der evolutionären Selektion durch die Umwelt und die globale Verteilung der Phylotypen, wie sie zum Beispiel für *Salmonella Typhi* gezeigt wurde (Roumagnac *et al.*, 2006). Die Cluster in dieser Arbeit sind nicht beschränkt durch natürliche Grenzen. Sie sind Pathogene vom selben Genotyp, der sich unabhängig von der räumlichen Herkunft oder von Orten der Isolation über die ganze Welt verteilt haben. Zusätzlich kann man annehmen, dass *E. coli*-Isolaten mit der Fähigkeit außerhalb des Darms zu überleben und Gewebe zu besiedeln, ein anderes, weiträumigeres Habitat als ihre Gegenstücke intestinalen Ursprungs besetzen. Genetisch manifestiert sich dieses in Phylotypen, die stark nach ihrem Habitat selektiert sind. Beispielhaft für dieses Phänomen sind die Stämme im ST117 und ST62. Sie bestehen jeweils ausschließlich aus extraintestinalen Isolaten und wurden in mehreren unterschiedlichen Ländern isoliert. Sie sind somit ubiquitäre pathogene Genotypen, die sich erfolgreich auf allen Kontinenten verbreitet haben, folgend ihrem Habitat Vogel bzw. Mensch.

In den beschriebenen ST-Komplex 95, ST-Komplex 73 und ST-Komplex 23 ist das Vorkommen von ExPEC-Pathovaren hoch. Zusätzlich befinden sich in dem beschriebenen ST-Komplex 95 auch *E. coli*, die aus dem Darm von nicht-erkrankten Menschen isoliert wurden und innerhalb anderer Forschungsvorhaben in die öffentliche Datenbank eingetragen wurden (Weissman *et al.*, 2006) und im MSTree als farbloser Anteil im ST dargestellt werden

(Abb. 3). Dies könnte auf eine schwächere Selektionskraft innerhalb dieses STs hinweisen, die zusätzlich auch zu nicht pathogenen Stämmen geführt hat (Zdziarski *et al.*, 2008). Alternativ zu dieser Hypothese könnten diese Isolate auch hochpathogene ExPEC sein, die jederzeit in diesen Tieren oder Patienten pathogene Prozesse auslösen können, wie sie es auch bei den Stämmen dieser Arbeit gemacht haben. In einer umfangreichen Arbeit mittels MLST bei Isolaten aus der phylogenetischen Gruppe B2 wurden 9 unterschiedliche Sub-Typen identifiziert (Le Gall *et al.*, 2007). Die Autoren schließen aus ihren Daten, dass die virulenten Eigenschaften der ExPEC- Stämme ein zufälliges Nebenprodukt bei der zurückliegenden Entwicklung innerhalb ihres kommensalen Lebensraums sind. Inwiefern solche spektakulären Aussagen aus dieser Studie möglich sind und nicht rein spekulativ sei dahingestellt. Die vielen unbekanntenen evolutionären Zusammenhänge in den betrachteten Stämmen aus unterschiedlichen Habitaten eröffnen vielfache Wege für künftige Studien zum besseren Verständnis des Auftretens neuer pathogener Klone. In ST-Komplexen mit Isolaten aus mehreren, unterschiedlichen Habitaten (z.B.: ST10, ST14 und ST100) ist die Biodiversität am stärksten ausgeprägt. Diese Arbeit erlaubt nur einen kleinen Einblick in die räumliche Verteilung von *E. coli*. Ähnliche phylogenetische Modelle sind aber auch für andere Pathovare vorstellbar und müssen noch untersucht werden.

5.2 Zoonotische Potentiale aus dem Blickwinkel des Genotyps

In früheren Analysen zu den Virulenz-assoziierten Faktoren (VF) wurde spekuliert, ob APEC das „Lager“ für diese VFs sind, aus denen NMEC und UPEC regelmäßig VFs akquirieren (Ewers *et al.*, 2007; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Die aviäre Kolibakteriose, *E. coli*-Urogenitaltraktinfektion (UTI) und die *E. coli*-Neugeborenen-Meningitis (NBM) sind Krankheiten mit unterschiedlicher Inzidenz, aber alle zeigen einen endemischen Charakter mit grundsätzlich gleichmäßiger Verteilung (May *et al.*, 2005; Stoll, 1997). Daraus lässt sich schließen, dass die direkte Wirt-zu-Wirt-Übertragung zwischen Erkrankten epidemiologisch nicht so relevant ist wie bei Ausbruch-Szenarien, die z.B. bei ETEC-Infektionen bekannt sind (Qadri *et al.*, 2005).

Wie bereits aufgezeigt wurde, sind die einzelnen ExPEC-Pathovare weit verbreitet. Eine Transmission von einem klinischen Fall zum nächsten ist - insbesondere bei NMEC - schwer vorzustellen und einzelne Infektionen können somit als „Sackgassen“ angesehen werden. Jedes pathogene Isolat stammt wiederkehrend aus einer Grundpopulation von speziellen Stämmen ab, die für die eigentliche Verbreitung der Infektionskrankheit sorgt. Aus dieser Arbeit lässt sich schließen, dass sich ExPEC vom ST95 ein Reservoir teilen und sich aus einem Pool endemischer Infektionen entwickeln. Dieser kann entweder menschlichen oder/und tierischen Ursprungs sein. Ähnliche Schlüsse wurden parallel auch in anderen Arbeitsgruppen aus MLST-Daten gewonnen (Moulin-Schouleur *et al.*, 2007; Weissman *et al.*, 2006). Dieses erklärt die epidemiologische Struktur *E. coli*-induzierter Erkrankungen und die Tatsache, dass jeweils Stämme aus dem gleichen Genotyp gefunden wurden. Die bestehenden Vorstellungen zur Pathogenese der jeweiligen Infektion bleiben bei allen drei Erkrankungen von dieser Hypothese unberührt. Die beschriebene Situation erklärt die Populationsstruktur der ExPEC innerhalb der STs. Deshalb kann man sagen, dass die zoonotischen Fähigkeiten der APEC den horizontalen Austausch von Virulenzdeterminanten übersteigen und APEC verantwortlich gemacht werden können für Fälle von UTI und NBM. Dies gilt nicht *per se* für alle menschlichen Infektionen, sondern nur für eine Untergruppe (Johnson *et al.*, 2008; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006). In dieser Arbeit ist dies der ST95, da die Überschneidung innerhalb der ST23, ST73 und dem ST117 viel kleiner ist. Die Stämme in diesen Phylotypen scheinen hauptsächlich nur eine Krankheitsform auszubilden und repräsentieren somit

eigenständige Reservoirs, deren Zusammenhänge noch untersucht werden müssen. Das Auftreten der Fälle von NBM aus dem ST62 mit äußerst niedriger Inzidenz und ohne Zusammenhang zu anderen Pathovaren wurde auch schon in anderen Arbeiten bemerkt (Yao *et al.*, 2006), bleibt zunächst undurchsichtig und ist sicherlich interessant für eine intensivere Betrachtung.

Bemerkenswert ist die hohe genetische Uniformität der K1-positiven Isolate, wie sie auch schon in vorherigen Analysen deutlich wurde (Wirth *et al.*, 2006). Dieses kann durch die Hypothese der phylogenetischen Hintergrund-Population - je Cluster eine - erklärt werden, die permanent Infektionen hervorbringt mit unterschiedlichen klinischen Manifestationen. Diese *E. coli*-Genotypen besetzen ökologische Nischen, die eventuell sehr stabil sind und dieses resultiert in einer hochkonservierten Populationsstruktur. Rekombinationsraten und Mutationsraten innerhalb dieser STs werden weitestgehend niedrig gehalten. Wie schon angemerkt, enthält die *E. coli*-Datenbank auch 39 Stämme des ST-Komplex 95, inklusive K1 isoliert aus dem Kot gesunder Menschen. Dies unterstützt die Hypothese der wiederkehrenden Infektionen durch eine Hintergrundpopulation. Nur durch die Diagnostik des Phylotyps kann dieses Risiko abgeschätzt werden. Die alleinige Bestimmung des Pathovars, basierend auf klinischen Erscheinungsbildern und Virulenz-assoziierten Faktoren, ist scheinbar weniger wichtig und beschreibt nur einen Wirts-Tropismus (Ron, 2006a) und individuelle Wirt-Adaptation und keine Wirt-Beschränkung (Roberts, 1996). Zusätzlich muss gesagt werden, dass viele Aussagen über die Virulenz der ExPEC-Stämmen und potentiellen Zoonose-Erregern im Tiermodell nicht aus den eigentlichen Wirten abgeleitet wurden (Picard *et al.*, 1999) und in ihrer quantitativen Aussage nicht signifikant erscheinen (Johnson and Kuskowski, 2000). Aufgrund der phylogenetischen Zusammenhänge bietet ein Infektionsmodell basierend auf Vögeln (Antao *et al.*, 2008) nach bisheriger Erkenntnis die beste Möglichkeit, mehr über alle ExPEC zu erfahren.

5.3 Das Problem der fehlenden Kongruenz zwischen PFGE und MLST

Ein besseres Verständnis für die verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb bakterieller Spezies wurde lange Zeit durch die wiederholte Einführung unterschiedlicher phylogenetischer Methoden behindert. Diese besitzen ungleiche Auflösungsvermögen und eine ungleiche Fähigkeit der Quantifizierung von Unterschieden im Genom (Achtman, 2002). In vorherigen Studien wurde erkannt, dass Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ein besseres Auflösungsvermögen besitzt und damit die Möglichkeit bietet, bakterielle Isolate sicher zu unterscheiden (Noller *et al.*, 2003; Tartof *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Ergebnisse bandenbasierter Methoden erhebliche Widersprüche in der Übereinstimmung mit Methoden, die auf DNS-Sequenzen basieren, aufzeigen. Die Fähigkeit zur Eingruppierung von Stämmen ist nicht hierarchisch und baut nicht auf Gruppenbildung durch MLST auf. Beide genannten Methoden basieren auf unterschiedlichen Merkmalen und führen zu unterschiedlichen und inkongruenten Ergebnissen. Aber welche Methode liefert die besseren Resultate? Bei dem Vergleich von diagnostischen Tests und der Beurteilung der erzielten Ergebnisse kommt es zwangsläufig zu der Frage, welcher Test von beiden der Goldstandard und somit der Verlässliche ist und welches diagnostische Verfahren minderwertig und - innerhalb der Beurteilung - der abhängige Test ist? Dies ist eine Frage an den Mikrobiologen und kann in diesem Fall nur aus der Biologie des Erregers und der Zusammensetzung seiner zu testenden Grundgesamtheit - der Phylogenie der Spezies - beantwortet werden.

Bei der Bestimmung der Phylogenie einer Spezies werden Subtypen eines Organismus spezifiziert, indem genetische Unterschiede für den Vergleich herangezogen werden. Ein spezieller Fokus wird dabei auf die epidemiologische Herkunft gelegt. Zwei Informationsquellen tragen wesentlich zur bakteriellen Diversität bei und werden detektiert: Erstens Punktmutationen, deren Entwicklung einer schwachen evolutionären Selektion unterliegt. Diese Daten kommen dem, was man molekulare Uhr nennt, am Nächsten (Kimura, 1980). Zweitens wird zusätzlich das Auftreten von horizontalem Gentransfer sowie die Insertion und Deletion von Fragmenten mit genetischem Material detektiert. Diese Unterschiede im Genom sind eher anfällig für Selektionsdruck und die Wahrscheinlichkeit, dass sie die zu detektierende Verbindung zwischen einzelnen Isolaten verwischen, ist hoch (Guttman and Dykhuizen, 1994). Das MLST-Schema bei *E. coli* basiert auf potentiellen Nukleotidaustauschen in DNS-Sequenzen innerhalb einer Länge von 3.423 Basenpaaren und erzeugt eine stabile Cluster-Analyse, die in Abb. 3 gezeigt wird. Indem man die sequenzierten sieben Haushalts-Gene gleichmäßig aus dem gesamten Genom gewählt hat erreichte man, dass die Auswirkungen der Rekombination auf die Ergebnisse minimiert werden. Horizontaler Genaustausch ist bei *E. coli* nicht in der Lage, die wahren phylogenetischen Verhältnisse unkenntlich zu machen (Wirth *et al.*, 2006).

PFGE bei *E. coli* mit dem Restriktionsenzym *XbaI* basiert unter anderem auf polymorphen Nukleotiden im Genom, die entweder zu einer Generierung neuer Restriktionsschnittstellen oder dem Verlust vorhandener Stellen führt. Die Anzahl dieser Stellen ist begrenzt und führt insgesamt zu einem Bandenmuster von 15 bis 20 Banden im sichtbaren Bereich. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine zufallsbedingte Auswechslung eines Nukleotids zur Analyse beiträgt ist viel geringer als bei dem Ansatz mit der MLST. Eine Quantifizierung dieses Beitrags der Mutationen innerhalb einer Cluster-Analyse ist umso schwieriger. Einen weiteren Beitrag zur Veränderung der Bandenmuster leistet der horizontale Genaustausch. Bei der PFGE wird das gesamte bakterielle Genom verdaut und potentiell sämtliche solcher Ereignisse werden detektiert. Banden werden mit einer hohen Wahrscheinlichkeit modifiziert und deshalb werden sie nicht mehr als gemeinsames Merkmal bei der Auswertung erkannt. Diese Veränderungen geschehen innerhalb eines kurzen phylogenetischen Zeitraums. Sie tragen aber alle während der Auswertung der Banden zum Datensatz bei und erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass die Information über die Verbundenheit zweier Isolate abbricht. Das Ergebnis sind niedrige Ähnlichkeitswerte zwischen Restriktionsmustern verwandter Stämme und niedrige Bootstrap-Werte in der statistischen Analyse, wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wurde (Abb. 6 und Abb. 7).

Selbst bei der Anwendung strikter Protokolle und ausreichend DNS-Marker-Läufen und Referenzläufen bleiben der Vergleich von ähnlichen Restriktionsmustern und ihre Auswertung schwierig. Bei dem Vorgang der Bandenzuordnung (band matching) in der Auswertungs-Software werden die Banden nur zu wenigen Bandenklassen zugeordnet (Kap. 3.2.3). Die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Bande resultiert später in einer binären Matrix, die für Vergleiche herangezogen wird (Applied Maths BVBA, 2006). Dieser Vorgang ist sehr anfällig für irreführende Ergebnisse, da unterschiedliche DNS-Fragmente zufällig als gleichartig erkannt werden und geringe Verschiebungen der Bandengröße bei der Auswertung gleiche Banden nicht mehr als zusammengehörig erkennt. Zusätzlich kann mangelhafter Verdau mit dem Restriktionsenzym zu fehlenden Banden führen, sowie zwei gleichgroße Restriktionsstücke werden in der Auswertung des Bildes nur als eines erkannt.

Diese Feststellungen stellen den Nutzen der PFGE für Langzeit-Epidemiologie und Phylogenie bei *E. coli* in Frage. In einer Studie zu ExPEC führte die Anwendung von MLST und PFGE zur erfolgreichen Detektion eines sich international verbreitenden Phylotyp (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008). In kritischen Kommentaren zur selben Arbeit wurde

bemerkt, dass die Interpretation von PFGE-Bandenmustern mit so genannten Ähnlichkeitswerten an disparaten Stämmen schwierig ist (Woodford, 2008). Der Nutzen der PFGE beschränkt sich bei Vergleichsstudien zwischen den Methoden in einer tiefgehenden Diskriminierung von Stämmen innerhalb eines ST-Komplexes (Beutin *et al.*, 2005; Nemoy *et al.*, 2005), wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wurde. Es bleibt aber kritisch anzumerken, dass der Vergleich von PFGE-Bandenmustern unterschiedlicher ST-Komplexe und deren mögliche Überschneidungen Auswirkung auf die Relevanz der PFGE innerhalb eines ST-Komplexes hat.

Je größer die Anzahl der Stämme innerhalb eines Dendrogramms desto größer werden die Probleme bei der Interpretation der erhaltenen Bilder aus der Software. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass nur einzelne PFGE-Muster visuell sicher und gut beurteilt werden können und automatisierte phylogenetische Bäume einer großen Anzahl von Stämmen weniger verlässlich sind. Diese können Ergebnisse aufzeigen, die im Sinn der Evidenz als nicht „wahr“ bezeichnet werden können. Der praktische Nutzen der PFGE beschränkt sich nach Meinung des Autors somit auf der Analyse umschriebener Ausbruchssituationen (Pearl *et al.*, 2007).

5.4 Grundsätzliche Überlegungen zur Auswahl von Typisierungsmethoden

Hochdiverse Spezies wie *E. coli* sind eine Herausforderung für Typisierungsmethoden, sowohl bei phylogenetischen Untersuchungen, als auch bei epidemiologischen Fragestellungen. Die Kongruenz unterschiedlicher Methoden ist grundsätzlich nicht immer gegeben. In einer grundlegenden Arbeit zur PFGE, die laut Web of Science seit seiner Veröffentlichung im Jahr 1995 3.078 Mal zitiert wurde, stellt Dr. Fred C. Tenover fest (Tenover *et al.*, 1995):

“The criteria for strain identity are stringent and are not appropriate for studies of large populations of organisms collected over extended periods of 1 year or longer”

Diesen Empfehlungen ist von vielen Anwendern nicht immer gefolgt worden (Gerner-Smidt *et al.*, 2006; Hilali *et al.*, 2000; Swaminathan *et al.*, 2001). Für *E. coli* kann man feststellen, dass der phylogenetische Hintergrund eine ausgedehnte Anwendung einiger Methoden nicht zulässt. Für andere bakterielle Spezies mit grundlegend anderen Populationsstrukturen (Abb. 1) gelten andere Vorgaben. Grundlegendes Wissen über die Phylogenie bakterieller Spezies ist somit auch für den Veterinärmediziner und Mediziner notwendig, für den häufig nur der Nutzen dieser Methoden für die Diagnostik und die Epidemiologie im Vordergrund steht.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Auswahl einer Methode ist die Fähigkeit, jedes Isolat überhaupt typisieren zu können. Nicht alle Stämme lassen sich auf Anhieb mit jedem Restriktionsenzym komplett verdauen, was zu einem signifikanten Ausfall bei Methoden führt, die auf der Anwesenheit unterschiedlicher Spaltstellen beruhen. Diese Proben müssen mit viel Aufwand vorbehandelt werden. Im Gegensatz dazu sind Haushalts-Gene *per definitionem* in allen Stämmen einer Spezies vorhanden und somit immer sicher bestimmbar. Die Ergebnisse einer molekularen epidemiologischen Untersuchung sollten mit den Beobachtungen klassischer epidemiologischer Methoden vereinbar sein. Bestenfalls ist ihre Fähigkeit in klinischen Untersuchungen oder im Tierversuch zu verifizieren. Validiert werden müssen Typisierungsverfahren an einer gut ausgewählten Stammsammlung, um die ganze Diversität der Spezies oder der Untersuchungspopulation zu bestimmen. Sowohl Ausbruchs-

Stämme, als auch unverwandte Isolate sollen eingeschlossen werden und wissenschaftlich nachzuvollziehende Ergebnisse liefern.

MLST bietet ein klares Typisierung-Schema und produziert numerische Daten für eine quantitative Analyse. Man kann sie auf eine endlose Anzahl von Stämmen ausweiten und über das Internet wird eine globale Plattform zum Vergleich von Verwandtschaftsdaten angeboten. Es liefert DNS-Sequenzen, die mit entsprechender Auswertungssoftware unzweideutig zu analysieren sind, und potentiell auch in mehreren Jahren noch nachhaltig vergleichbar sind. Klare phylogenetische Interpretationen sind möglich und so wird dem Nutzer ein tiefer Einblick in die Mikroevolution unterschiedlicher bakterieller Spezies geboten (Dingle *et al.*, 2002; Enright *et al.*, 2002; Harmsen *et al.*, 2003; Maiden *et al.*, 1998; Roumagnac *et al.*, 2006). Die MLST-Datenbank bei *E. coli* hat schon wichtige Erkenntnisse zu der Phylogenie einiger Pathovaren geliefert. (Feng *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2006; Le Gall *et al.*, 2007; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007; Weissman *et al.*, 2006; Wirth *et al.*, 2006). Alleine die Tatsache, dass die Genome in dieser Spezies zwischen 5,5 Millionen Basenpaaren (Mbp) im Prototyp-Stamm EDL933 und 4,6 Mbp im Stamm MG1655 variieren, spricht für die Einführung einer Klassifizierung basierend auf Haushaltsgenen mit der höchstmöglichen Unabhängigkeit von horizontalem Gentransfer. Internationale Vernetzung und der vermehrte Eintrag von Daten in die MLST-Datenbank kann zur Einführung von neuen und verbesserten Vorstellungen der *E. coli*-Populationsstruktur führen.

5.5 Die Signifikanz bakterieller Populationsmodelle für die Epidemiologie

Die Diversität bakterieller Spezies und die Beiträge von Mutationen und Rekombination, die die Formulierung von Verwandtschaftsverhältnissen auf unterschiedlicher Ebene zulassen, erfahren einen enormen wissenschaftlichen Fortschritt (Achtman, 2008; Maynard Smith *et al.*, 1993). Diese Diskussion hat enorme Auswirkungen auf die medizinische Mikrobiologie und Epidemiologie (Achtman, 2002). Die Detektion und der Vergleich von polymorphen Stellen in Haushaltsgenen mittels MLST sind zu Recht zu dem wichtigsten Werkzeug geworden, um die Langzeit-Epidemiologie bakterieller Pathogene zu bestimmen. Die daraus abgeleiteten neuen Vorstellungen zur Mikroevolution haben große Auswirkungen für die medizinische und veterinärmedizinische Mikrobiologie, da hierdurch ein verbesserter Einblick in die Diversität bakterieller Pathogene geboten wird. Adäquate Methoden sind hierfür selbstverständlich notwendig (Spratt, 2004). Ein Klassifikationschema für die Pathovaren bei *Escherichia coli* basierend auf Phylotypisierung ist aufgrund der Diversität angemessener, als eines, das sich auf das klinische Erscheinungsbild verlässt. Einzelne Stämme aus Querschnittstudien oder Ausbruchssituationen müssen im Kontext der gesamten Spannbreite der Spezies gesehen werden. Es muss ein Modell geschaffen werden in dem jede Subpopulation innerhalb der Spezies durch spezifische Analyse-Stämme repräsentiert wird. Dies ermöglicht in einem nächsten Schritt die phylogenetisch begründete Auswahl von Laborstämmen für tiefer gehende molekularbiologische Untersuchungen (Pearson *et al.*, 2004) oder die Wahl eines Stammes als Kandidat für z.B. die Impfstoffherstellung (Mora *et al.*, 2006). Zusätzlich kann die Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten in Bezug auf phylogenetischen Gruppen zur Erkennung von Hochrisikokollektiven führen, die Träger spezifischer Pathogene sind. Insbesondere ist dies auch für die veterinärmedizinische Bestandsbetreuung bei Geflügel von großem Nutzen und ist somit die Basis für eine bessere Prophylaxe wie auch für eine verbesserte Therapie.

5.6 Die Bestimmung serologischer Gruppen und ihr phylogenetischer Hintergrund

In den vorherigen Kapiteln wurde der Nutzen der MLST für die bakterielle Phylogenie herausgestellt. Das Verhältnis zwischen dem phylogenetischen Hintergrund einzelner Stämme und der Expression antigener Strukturen ist wichtig für die Beurteilung dieser serologischen Gruppen. Dies gilt nicht nur für ExPEC, sondern auch für andere *E. coli* und weitere bakterielle Spezies. Die Einteilung nach O-Typen erfolgt auf der Basis des Vorhandenseins bestimmter Oberflächenantigene, ihrem Nachweis mit Serumagglutination und der Formulierung eines Einteilungsschemas (Orskov and Orskov, 1975). Im Gegensatz dazu basiert die MLST auf der Detektion von Nukleotid-Austauschen in neutralen Haushalts-Genen und der computergestützten Formulierung von STs und ST-Komplexe (Maiden *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Datenbasis ist eine Kongruenz zwischen beiden Methoden zwar wünschenswert, aber nicht notwendigerweise gegeben. In Kap. 4.5 und Tab. 5 wurde aufgezeigt, dass die somatischen O-Typen O1, O2 und O78 bei APEC polyphyletisch sind und nicht auf einen ST beschränkt sind. Für viele APEC-assoziierten O-typen wurde dies zusätzlich auch in weiteren Studien eindrucksvoll gezeigt (Ewers *et al.*, 2004b; Ewers *et al.*, 2007; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Ron, 2006b). Dies macht es als epidemiologische Methode wenig brauchbar, da Zufallszusammenhänge nie ausgeschlossen werden können. Dies ist ein Hinweis, dass eventuell viele O-Typen nur wenig konkordant zu bestimmten Wirts-Spezies und Krankheitsbildern sind. Im Gegensatz dazu ist in dieser Arbeit der K-Typ K1 phylogenetisch hochkonserviert unter den Stämmen.

Die gezeigten Unterschiede bei der Phylogenie der unterschiedlichen serologischen Gruppen bei APEC wirft die Frage auf, ob dies nur für diese wenigen O-Typen innerhalb dieses Pathovars gilt oder auch für andere Pathovare bei *E. coli*. Die Nutzer der öffentlichen MLST-*E. coli*-Datenbank können die Angaben zu den Serotypen zusätzlich zu den DNS-Sequenzen über das Internet eingeben. Somit lässt sich aus diesem Datensatz ein Überblick über eine Vielzahl von Serotypen im Verhältnis zur MLST erlangen, aus dem nun zwei weitere Beispiele vorgestellt werden.

Der Serotyp O157:H7 ist assoziiert mit dem Shiga-Toxin und ist Verursacher schwerer Erkrankungen beim Menschen – dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS). Er wurde schon bei Verwandtschaftsanalysen unterschiedlicher epidemischer Ausbrüche als eine sehr einheitliche Gruppe identifiziert (Noller *et al.*, 2003).

Die Analyse im MSTree zeigt in Abb. 10 dass sich die 11 O157:H7-Stämme auf den ST11 beschränken und durch die MLST mit sieben Haushalts-Genen nicht zu differenzieren sind. Er ist somit als ein - aus evolutionärer Sicht – neuer, pathogener Phylotyp anzusehen (siehe auch Abb. 1). Die eingetragenen Stämme stammen von unterschiedlichen Krankheitsfällen von HUS in Deutschland, USA, Argentinien und Japan und unterstreichen so die weltweite Verbreitung dieses STs. ST11 und die verwandten Einzelnukleotid-varianten ST61 und ST335 enthalten zusätzlich noch sechs Isolate vom Serotyp O157:H- und sechs Isolate O55, mit denen O157 schon vorher als eng verwandt angesehen wurde (Whittam *et al.*, 1993). Dieses ist ein Beispiel für eine gute epidemiologische Konkordanz zwischen O-Typ, phylogenetischem Sequenztyp und klinischer Erscheinungsform. Diese Gruppe von *E. coli*-Isolaten wird von allen Methoden als einheitlich erkannt.

E. coli-Stämme vom Typ O111 sind ebenfalls assoziiert mit HUS und wurden schon vorher als inhomogene Gruppe von Stämmen gezeigt, mit dem Potential zur Entwicklung neuer pathogener Linien (Zhang *et al.*, 2007). Ist somit dieser O-Typ über mehrere phylogenetische Linien verteilt oder verhält es sich ähnlich zu O157:H7? In der MLST-Datenbank sind 21 O111-Stämme eingetragen, die in Abb. 10 im MSTree zu sehen sind.

Abb. 10: MSTree mit ausgewählten O-Typen und *E. coli*-Gesamtgenome

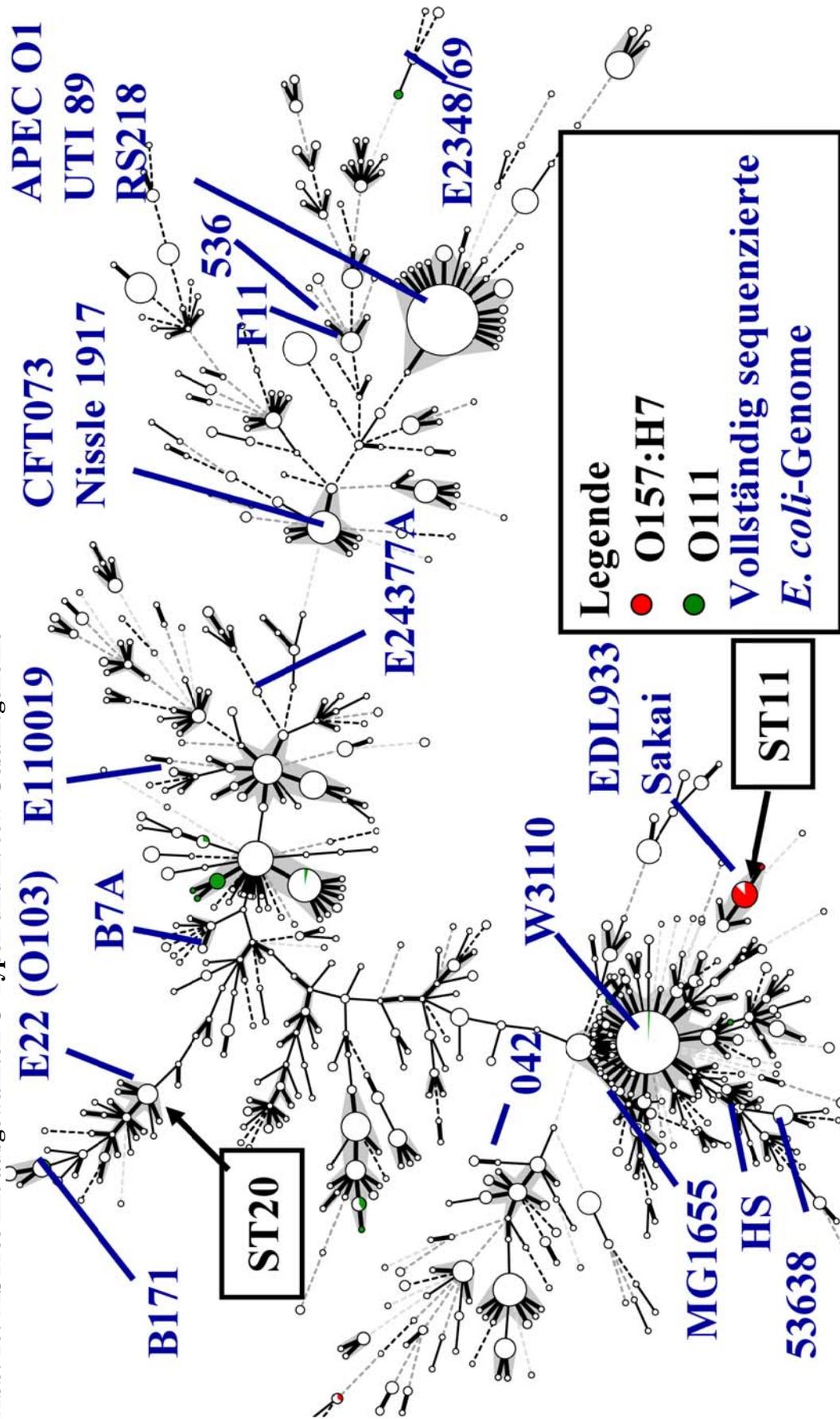


Abb 10: MSTree der *E. coli*-Gesamtpopulation. Als Beispiele für die unterschiedliche Form der Verteilung der Serotypen sind sämtliche Stämme, die mit den Oberflächen-Antigenen O111 und O157:H7/H- an die MLST-Datenbank gemeldet wurden dargestellt. Zusätzlich sind die STs sämtlicher sequenzanalysierter *E. coli*-Genome eingetragen und geben somit Auskunft über die phylogenetischen Zusammenhänge dieser Stämme (Kap. 5.7).

Diese lassen sich in 12 unterschiedliche STs innerhalb fünf ST-Komplexe einordnen. Im Gegensatz zu O157 stammt dieser O-Typ aus mehreren phylogenetischen Ursprüngen. Die Streuung im MSTree bestätigt die hohe phylogenetische Diversität von Stämmen mit demselben Oberflächen-Antigen O111. Im Gegensatz zu ihrem O-Typ stehen diese Stämme epidemiologisch nicht unbedingt in Verbindung.

Ein Blick auf die einzelnen STs der MLST verdeutlicht, dass nicht nur einzelne Oberflächen-Antigene eine hohe Diversität zeigen, sondern auch im Umkehrschluss einzelne phylogenetische Gruppen eine Vielzahl von Stämmen mit unterschiedlichen O-Typen tragen. Besonders deutlich wird dieses Phänomen anhand des ST20 (Tab. 9 und Abb. 10).

Tab. 9: Vielseitigkeit der somatischen Oberflächen-Antigene im ST20

Stamm	O-Typ	Ursprung	Zeitpunkt	Herkunft	Pathovar
33451	O4	Taube	1991	Deutschland	EHEC
3757	O15	Rind	unbekannt	England	unbekannt
5294	O15	Rind	unbekannt	England	unbekannt
3028	O49	Kaninchen	unbekannt	England	unbekannt
4003	O71	Kaninchen	unbekannt	England	unbekannt
4672	O88	Boden	unbekannt	England	unbekannt
E22	O103:H2	Kaninchen	1982	Frankreich	EPEC
4285	O128	Rind	unbekannt	England	unbekannt
HC45	O119:H2	Mensch	1999	Brasilien	EPEC
HC75	O119:H2	Mensch	2000	Brasilien	EPEC
284/97	O128:H-	Mensch	1997	Deutschland	EHEC
DEC11A	O128:H2	Mensch	1975	USA	EPEC
HI 8	O128:H-	Mensch	1990	Kanada	EHEC
HC10	O128:H-	Mensch	1999	Brasilien	EPEC
T110	O135:H-	Taube	1998	Deutschland	EHEC
3328	O145	Boden	unbekannt	England	unbekannt
Trh6	unbekannt	Mensch	2002	Norwegen	EPEC
Trh13	O51	Mensch	2002	Norwegen	EPEC
Trh45	O51	Mensch	2002	Norwegen	EPEC
2861	unbekannt	Rind	unbekannt	England	unbekannt
3636	unbekannt	Rind	unbekannt	England	unbekannt

Auszug aus der öffentlichen Datenbank unter <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst/dbs/Ecoli>. Stand: Oktober 2008.

Die 21 eingetragenen Isolate aus der *E. coli*-Datenbank stammen aus drei unterschiedlichen Tierarten, dem Menschen und aus dem Boden und wurden in sieben unterschiedlichen

Ländern zu unterschiedlichen Zeiten isoliert. Mit diesem ST wurden elf unterschiedliche O-Typen eingetragen, die mit der MLST nicht unterschieden werden können. Nur der Typ O128 - einschließlich des Referenzstamms DEC11A - kommt mehrmals vor, was die Bedeutung dieses STs unterstreicht. Der EPEC-Prototyp-Stamm E22 (O103) ist ebenfalls im ST20. Dies verdeutlicht die fehlende Übereinstimmung zwischen den traditionellen Methoden der Serologie und neuen phylogenetischen Ansätzen.

Bei der Serotypisierung sind die eingeführten Systeme oft alt und führen zu Untersuchungen, die sich nicht einordnen lassen oder zu unspezifischen Agglutinationen. Ein grundlegendes Problem bei der Einführung dieser Typisierungsschemata war die unglaubliche Vielseitigkeit der Spezies *Escherichia coli* aus phylogenetischer Sicht. Bei der Einführung der Serotypen war dieses Wissen nicht vorhanden. Es wurden somit unterschiedliche Genotypen in den gleichen serologischen Gruppen zusammengefasst, da ihre Unterscheidung nicht möglich war und auch nicht notwendig erschien. Diese Nomenklatur hat sich zwar in der medizinischen Mikrobiologie eingebürgert, darf aber heutzutage nicht mehr als striktes Kriterium aufgefasst werden.

Die Entwicklung von spezifischen Nachweisen von Antigenen wurde bei unterschiedlichen bakteriellen Spezies zur Identifizierung von Krankheitserregern entwickelt. Der Zusammenhang zwischen phylogenetischen und serologischen Gruppen muss für viele Pathogene herausgearbeitet werden und am Beispiel der Salmonellen soll ein kleiner Einblick dies verdeutlichen. *Salmonella* ist wie *Escherichia* eine Gattung innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae*. Salmonellose sind häufig Zoonosen und haben eine hohe Bedeutung in der Veterinärmedizin. Analog zu *E. coli* wurden basierend auf O- und H-Antigenen, ein Typierungs-Schema entwickelt (Kauffman-White-Schema) was zu einer traditionellen Nomenklatur geführt hat (Popoff and Le Minor, 2001). Diese wird kontinuierlich weiterentwickelt und enthält über 2.500 sogenannte Serovare innerhalb der Spezies *Salmonella enterica* spp. *enterica*. Eine MLST-Datenbank für diese Spezies ist ebenfalls am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie erreichbar und man kann die DNS-Sequenzen auf der entsprechenden Website erlangen und als MSTree darstellen (Abb. 11). Die Informationen zu den Serovaren sind innerhalb der Analyse dargestellt und die Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* sind exemplarisch hervorgehoben. Dies verdeutlicht, inwiefern die Zusammenhänge zwischen Serologie und Phylogenie spezifisch für jede bakterielle Spezies sind.

Im Vergleich zu *Escherichia coli* hat diese Spezies eine stark abgegrenzte Aufteilung von STs und ST-Komplexen mit einigen großen phylogenetischen Gruppen mit vermehrtem Vorkommen und, im Gegensatz zu *E. coli*, wenigen Typen in den Verbindungen zwischen den großen ST-Komplexen und Primär-Genotypen „founding genotype“. In der Übersicht bilden die unterschiedlichen Serovare in den meisten Fällen fest umrissene und klare Zusammenhänge. Es gibt nur Einzelfälle, in denen sich zwei Serovare in einem ST finden lassen. Der Serovar *S. Typhimurium* beinhaltet einen großen ST (ST19) als Primär-Genotyp, neun Einzelnukleotid-Varianten und weitere drei verwandte STs. Der Serovar *S. Enteritidis* besteht aus einem Primär-Genotyp ST11, zwei Einzelnukleotid-Varianten und zwei verwandten STs. Diese beiden Serotypen sind exemplarisch für die komplette Struktur innerhalb des MSTree bei Salmonellen. Eine vermehrte Streuung dieser Serovare ist nicht zu beobachten. Das Kauffman-White-Schema bei den Salmonellen bietet aus phylogenetischer Sicht somit ein deutlich besseres Typisierungsverfahren als die O-Typen bei *E. coli*. Die damit verbundene Nomenklatur kann auch durch neuere Methoden wie z.B. MLST bestimmt werden und in der Zukunft weiter ergänzt werden. Bei *E. coli* muss ebenfalls über eine Ablösung der vorhandenen Schemata nachgedacht werden.

Abb. 11: *Salmonella enterica* spp. *enterica*-Serovare innerhalb der Gesamtpopulation dieser Spezies

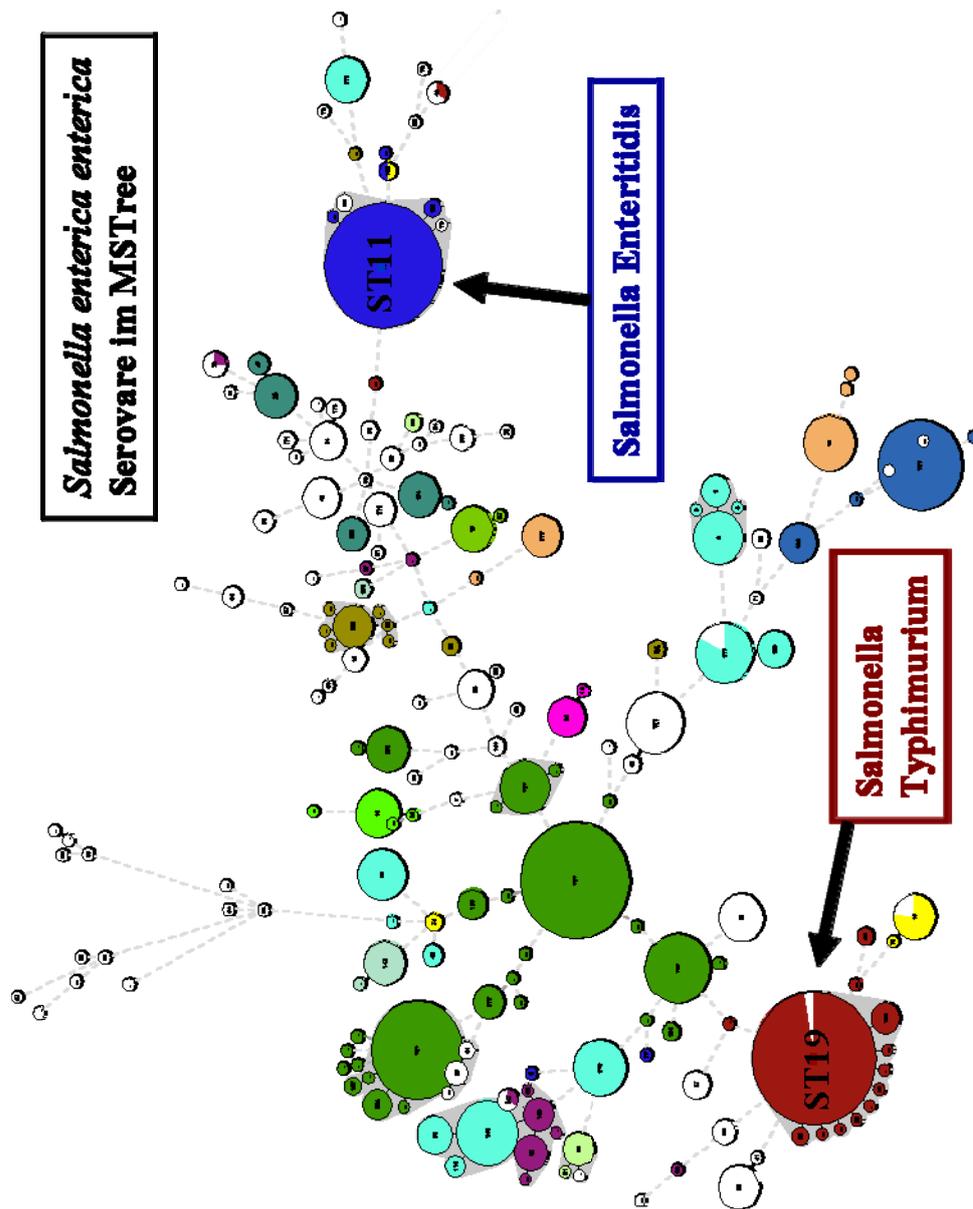


Abb. 11: MSTree der MLST-Daten aus der öffentlich zugänglichen Datenbank unter (<http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst/dbs/Senterica>). Stand: August 2008. STs werden als Kreise präsentiert, deren Radius proportional zur Anzahl der gefundenen Stämme ist. Die Serovare des Kauffman-White-Schemas sind spezifisch farblich innerhalb der STs dargestellt.

5.7 DNS-Sequenzanalysen bakterieller Genome - Ein Ausblick

In den letzten Jahren ist ein rasanter Abfall in den Kosten für die Sequenzanalyse ganzer Genome beobachtet worden (Service, 2006). Dadurch können vermehrt Einzelnukleotid-Polymorphismen „single nucleotide polymorphism“ (SNP) entdeckt werden, die in Zukunft eine feinere Unterscheidung von bakteriellen Stämmen erlauben. MLST mit sieben Haushalts-Genen detektiert nur einen kleinen Teil der unterscheidenden SNPs und dieser kann natürlich massiv erhöht werden, um die Diskriminationsfähigkeit zu erhöhen. Zusätzlich kann dadurch die komplette genetische Ausstattung pathogener Stämme verglichen werden und nicht nur ein kleiner Ausschnitt. Dies eröffnet die Möglichkeit für die medizinische Mikrobiologie, ganz neue Wege zu gehen und mehr über die Rolle und Verteilung genetischer Faktoren herauszufinden (Manning *et al.*, 2008; Kaper and Karmali, 2008).

Tab. 10: Publierte Gesamtgenome mit phylogenetischem Hintergrund

Stamm	Pathovar	ST	ST-K.	bp	GeneBank	Literatur
APEC-O1	APEC	95	95	5,1	CP000468	direkt GeneBank
RS218	NMEC	95	95	5,2	genome.wisc.edu	(Xie <i>et al.</i> , 2006)
UTI 89	UPEC	95	95	5,1	CP000243	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
CFT073	UPEC	73	73	5,3	AE014075	(Welch <i>et al.</i> , 2002)
536	UPEC	92	kein	4,9	CP000247	(Brzuszkiewicz <i>et al.</i> , 2006)
F11	UPEC	127	kein	5,2	AAJU00000000	direkt GeneBank
042	EAEC	414	kein	4,6	in Bearbeitung	www.genomesonline.org
EDL933	EHEC	11	11	5,5	AE005174	(Perna <i>et al.</i> , 2001)
Sakai	EHEC	11	11	5,6	BA000007	(Hayashi <i>et al.</i> , 2001)
53638	EIEC	6	6	5,3	AAKB00000000	direkt GeneBank
E22-O103	EPEC	20	20	5,5	AAJV00000000	direkt GeneBank
B171	EPEC	3	20	5,3	AAJX00000000	direkt GeneBank
E110019	EPEC	381	310	5,4	AAJW00000000	direkt GeneBank
E2348/69	EPEC	15	kein	5,1	in Bearbeitung	www.sanger.ac.uk
B7A	ETEC	94	kein	5,2	AAJT00000000	direkt GeneBank
E24377A	ETEC	188	kein	5,0	AAJZ00000000	direkt GeneBank
MG1655		98	10	4,6	U00096	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
Nissle1917		73	73	4,8	in Bearbeitung	www.genomesonline.org
HS		46	6	4,6	AAJY00000000	(Levine and Rennels, 1978)
W3110		10	10	4,6	AP009048	(Riley <i>et al.</i> , 2006)

Stand: Oktober 2008. ST= Sequenztyp; ST-K.= ST-Komplex; bp= Länge in Million Basenpaare

In diesem Kapitel soll betont werden, dass vor der Auswahl von Prototypstämmen zur kompletten Sequenzanalyse immer eine phylogenetische Untersuchung und die Bestimmung des Genotyps notwendig ist. Dies ist auch von großer Bedeutung, um Fehlinterpretationen in der funktionellen Mikrobiologie auszuschließen. Dies kann zu einer repräsentativeren Auswahl von Prototyp-Stämmen führen, ohne dass die Gefahr eines Selektions-Bias besteht, der zu einer Verzerrung des Gesamtbildes führt und sogar falsche Ergebnisse liefern kann (Pearson *et al.*, 2004). In Abb. 10 und Tab. 10 ist eine Übersicht über bisherige Projekte bei *E. coli* inklusive ihrem ST und der phylogenetischen Einordnung im MSTree dargestellt.

Zwanzig STs von *E. coli*-Isolaten, deren Gesamtgenom publiziert ist oder kurz vor der Vollendung steht, konnten recherchiert werden und wurden zum Vergleich im MSTree der *E. coli*-Gesamtpopulation visualisiert. Die beiden EHEC-Stämme EDL933 und das Isolat aus dem Sakai-Ausbruch befinden sich im ST11 mit den anderen O157-Stämmen in der gleichen phylogenetischen Linie. Die vier weiteren Träger des *eae* sind E2348/69 im ST15, E110019 im ST381, E22 im ST20 und B171 im ST3. Alle diese Stämme sind von unterschiedlichen Genotypen. Die ersten drei sind außerhalb eines ST-Komplexes, während E22 und B171 verwandt mit anderen intestinal pathogenen Isolaten sind. Der ST95 ist als phylogenetischer Typ für APEC, UPEC und NMEC bereits beschrieben und jeweils ein Pathovar aus diesem ST wurde bisher sequenzanalysiert. Der ST-Komplex 10 ist der phylogenetische Typ der beiden K12-Stämme MG1655 und W3110. Der UPEC-Stamm 536 (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006) ist das einzige Isolat in seinem ST und auch mit anderen UPEC nicht phylogenetisch verwandt. Somit ist er als Repräsentant für bedeutende evolutionäre Linien von UPEC nur von geringer Bedeutung. Dies ist bemerkenswert, da mehrere bakteriologische Studien diesen als Prototyp-Stamm genutzt haben (Dobrindt *et al.*, 2002; Hochhut *et al.*, 2006; Janke *et al.*, 2001; Middendorf *et al.*, 2004; Wilde *et al.*, 2008). Viele genetische Ursprünge, die durch STs mit einer großen Anzahl von Stämmen im phylogenetischen Baum repräsentiert werden (z. B.: ST29, ST21, ST23, ST88, ST69 und ST117), sind bis jetzt noch nicht zur Sequenzanalyse ausgesucht worden. Sie stellen Lücken dar und sollten bei zukünftigen Analysen bevorzugt berücksichtigt werden.

Die polymorphen Stellen im bakteriellen Genom besitzen ein hohes Potential für phylogenetische Untersuchungen. Bestimmungsfehler erfolgen aber, falls für die jeweilige Fragestellung die phylogenetisch unpassenden Referenzstämme ausgesucht werden, und aus den gewonnenen Vergleichsdaten auf eine größere Grundgesamtheit geschlossen wird. Bei molekularen Analysen mit dem Stamm CFT073 darf eigentlich nur auf die phylogenetische Gruppe innerhalb des zugehörigen ST-Komplexes (ST-Komplex 73) geschlossen werden. Jeder Stamm, den man in eine Studie einschließt, muss repräsentativ für eine Subpopulation im formulierten, hypothetischen Populationsmodell sein. Vergleicht man z.B. die Genome der Stämme CFT073 und UPEC 536 miteinander, so wird man die große Variabilität der *E. coli*-Population nicht erfassen können (Abb. 10, links) und auch die zentrale Rolle des ST-Komplex 95 nicht erschließen. Die Auswahl der Prototyp-Stämme muss aufgrund der gesamten Spannweite der Studienstämme erfolgen, so dass eine Extrapolation auf eine größere Gruppe von Isolaten zulässig ist. Eine ausschließliche Untersuchung an einem einzigen APEC-Phylotyp kann die ganze Bandbreite an APEC-Stämmen innerhalb dieser Arbeit nicht erfassen. Die Verteilung der *E. coli*-Stämme im phylogenetischen Baum ist somit wichtig für die Beurteilung des Verwandtschaftsgrades und die damit einhergehende Relevanz der gefundenen Unterschiede zwischen den gewählten Untersuchungsobjekten.

MLST bei *E. coli* hat bewiesen, dass es in der Lage ist, mit sieben Haushalts-Genen dieses Taxon unterhalb der Speziesebene gut und sinnvoll zu diskriminieren. Schon die Ergebnisse im Oktober 2008 zeigen die große Bandbreite, die der maximalen Diversität bei *E. coli* eventuell schon sehr nahe kommt. Die Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP)

innerhalb dieser Haushalts-Gene der phylogenetischen Gruppen könnten genutzt werden, um mit modernen Methoden mit hohen Durchsätzen Tausende von Isolaten zu klassifizieren. Dafür können evtl. werden sogenannte „markierende“ SNPs bestimmt werden, die definierte bakterielle Merkmale oder phylogenetische Gruppen widerspiegeln. Durch die Bestimmung eines einzigen SNPs oder alternativ einer kleinen Gruppe an SNPs (indizierender SNP Set) (Filliol *et al.*, 2006) könnte in Zukunft die komplette MLST ersetzt werden und die gleiche diagnostische Information erlangt werden (Honsa *et al.*, 2008).

Tab. 11: Indizierende SNPs für die Markierung von STs innerhalb dieser Arbeit

Charakteristik	Position im Allel	Position im Gen	Austausch	Locus	Typ
ST-K. 95	<i>icd</i> (13)	<i>icd</i> (160)	C-T	CAGT C GAGA	synonym
ST-K. 23	<i>gyrB</i> (185)	<i>gyrB</i> (525)	C-T	AAAC C TTCA	nicht-synon.
ST62	<i>adk</i> (148)	<i>adk</i> (148)	A-T	AAGC A AAAG	synonym
ST62	<i>adk</i> (364)	<i>adk</i> (397)	T-A	GTGT T TATC	nicht-synon.
ST62	<i>adk</i> (412)	<i>adk</i> (445)	T-G	ACGT T ACCG	synonym
ST62	<i>icd</i> (196)	<i>icd</i> (343)	G-C	CTCT G AACG	nicht-synon.
ST62	<i>purA</i> (157)	<i>purA</i> (501)	C-T	AAAT C GAAG	synonym
ST62	<i>recA</i> (508)	<i>recA</i> (820)	C-A	ACGG C GA--	synonym
ST117	<i>fumC</i> (323)	<i>fumC</i> (532)	C-T	CGCG C ATTT	nicht-synon.
ST117	<i>gyrB</i> (399)	<i>gyrB</i> (739)	A-G	CCGA A AAAG	nicht-synon.
ST117	<i>icd</i> (511)	<i>icd</i> (658)	T-G	TTGC T AACG	nicht-synon.
ST117	<i>mdh</i> (422)	<i>mdh</i> (654)	G-A	GCCT G GGCC	synonym

Indizierende SNPs für ExPEC in einigen STs und ST-Komplexe (ST-K.) in dieser Arbeit. Als Charakteristik wird die zu detektierende Gruppe bezeichnet. Es sind die Positionen in den MLST-Allelen und dem ORF der sieben Haushaltsgene (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) dargestellt. Austausch= Nukleotid-Austausch; nicht-synon.= nicht synonyme Mutation

Für die ExPEC in den schon beschriebenen STs und ST-Komplexen (Abb. 3) konnten solche markierende SNPs in den DNS-Sequenzanalysen dieser Arbeit gefunden werden. Diese können zurzeit die jeweiligen Phylotypen der ExPEC von den anderen Stämmen der MLST unterscheiden und sind in Tab. 11 zusammengefasst. Sämtliche Stämme im ST-Komplex 95 haben einen markierenden SNP in Position 13 des *icd*. Gleiches gilt für den ST-Komplex 23 und der Position 185 im *gyrB*. Die phylogenetisch vereinzelt liegenden ST117 und ST62 lassen sich gleichzeitig durch mehrere SNPs detektieren. Es muss bei diesem Vorgehen aber beachtet werden, dass durch eine ständige Zunahme der Stämme in der Datenbank auch ständig neue Allele gefunden werden und somit die Bestimmung eventuell seine absolute Gültigkeit verliert.

Diese SNPs können die Basis für Detektionsverfahren für eine Vielzahl an ExPEC-Stämmen sein. Dies bietet Vorteile, da ein hoher Stichprobenumfang die Qualität epidemiologischer Studien mitbestimmt. Für einen hohen Durchsatz an Stämmen bei relativ wenigen einzelnen SNPs bieten sich in Zukunft Realtime-PCR-Verfahren (z.B.: TaqMan), Methoden basierend auf Kapillar-Elektrophorese (z.B.: SNPlex) (Syvanen, 2001) oder die multiplexe SNP-Detektion mittels der Luminex-Technologie (Dunbar *et al.*, 2003) an.

6 Zusammenfassung

Molekulare Epidemiologie und Mikroevolution aviärer extraintestinal pathogener *Escherichia coli* (APEC)

Die Vielseitigkeit der Spezies *Escherichia coli* ist seit vielen Jahren eine Herausforderung, einerseits für die Biologie, die ihren Blickwinkel auf die bakterielle Phylogenie gerichtet hat, andererseits für die Medizin bzw. Veterinärmedizin und ihrem epidemiologischen Interesse. Innerhalb dieser Arbeit werden Konzepte vorgestellt, die wichtige Fragestellungen zur genetischen Struktur und Mikroevolution von Pathogenen beantworten können und zu einem besseren Einblick in die Verwandtschaftsverhältnisse bei *E. coli* führen.

Die bakterielle Subtypisierung ist eine aufstrebende Disziplin und trägt stark zu unserem Verständnis der Epidemiologie von Krankheitserregern bei. Die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen angewandten Methoden und ihre epidemiologische Interpretation sind immer noch umstritten. Multilocus Sequence-Typing (MLST) und die Bildung von Sequenztypen (ST) ist eine konservative Typisierungsmethode, die auch für phylogenetische Analysen genutzt werden kann. Sie beruht auf der Detektion von Unterschieden in mehreren konservierten Haushalts-Genen und führt mit entsprechender Auswertungssoftware zu einem umfassenden Klassifizierungsschema für hochdiverse Spezies.

In dieser Arbeit wurde MLST auf eine Gruppe von 151 extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) angewandt. Diversität, epidemiologische Zusammenhänge und phylogenetische Ursprünge dieser Stämme sind bis jetzt unklar. Die ausgesuchten Isolate stammten aus drei unterschiedlichen Pathovaren. Im Mittelpunkt dieser Untersuchung standen die aviären pathogenen *E. coli* (APEC), die die Erreger der Kolibakteriose bei Vögeln - insbesondere beim Wirtschaftsgeflügel - sind. Darüber hinaus wurde die phylogenetische Verwandtschaft zu den uropathogenen *E. coli* (UPEC), sowie Neugeborenen-Meningitis-assoziierten *E. coli* (NMEC) beim Menschen untersucht. In der Populationsstruktur der ExPEC zeigte sich eine Dichotomie. Einerseits existierten ExPEC-Stämme, die über die gesamte *E. coli*-Population verteilt waren, andererseits häuften sich ExPEC-Stämme in bestimmten phylogenetischen Gruppen an (ST-Komplex 95, ST-Komplex 23 und ST-Komplex 73, sowie ST117 und ST62). Diese Ansammlungen von Stämmen besaßen signifikant mehr Virulenz-assoziierte Gene, als die phylogenetisch verteilten ExPEC-Stämme. Die meisten Untersuchungsstämme befanden sich im ST95. Dieser schloss ExPEC aller drei analysierten Pathovaren ein und war stark verbunden mit dem Kapsel-Typ K1. Diese Ergebnisse bestätigten das Zoonose-Potential der APEC, entweder als direkte Erreger, als Reservoir für wiederkehrend auftauchende Klone oder als Verteiler für Virulenzfaktoren. Darüber hinaus zeigte das Auftreten von mehreren phylogenetischen Gruppen bei ExPEC eine unabhängige und parallele Evolution über Millionen von Jahren. Daraus lässt sich schließen, dass diese Erreger eventuell unterschiedliche Pathogenese-Mechanismen haben und auch ein spezifisches epidemiologisches Muster aufweisen.

In den letzten Jahren entwickelte sich MLST zum Standard phylogenetischer Untersuchungen bei *E. coli*. In einer umfangreichen Vergleichsanalyse mit dem Typisierungsverfahren Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) fiel auf, dass beide Methoden Widersprüche aufzeigen und weder kongruent zueinander sind, noch aufeinander aufbauen. Die genetische Grundlage, die die Datenbasis für beide Methoden liefert, besteht in unterschiedlichem Maße aus Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) und horizontalem Genaustausch. Bezüglich *E. coli* zeichnet sich die PFGE durch ein hohes Diskriminierungsvermögen aus und ist daher gut geeignet für begrenzte Ausbruchsanalysen.

Für weitergehende Klassifizierungen und ausgedehnte phylogenetische Studien lieferte diese Methode aber keine fundierte Datenbasis.

Als ein weiteres Mittel zur Einteilung unterhalb der Spezies-Ebene werden bakterielle Taxa seit einigen Jahrzehnten aufgrund antigener Strukturen in Serotypen eingeteilt. Am Beispiel des Oberflächen-Antigens (O-Typ) wurde verdeutlicht, dass die phylogenetischen Hintergründe der einzelnen O-Typen sehr unterschiedlich sein können und bei *E. coli* nicht immer eindeutig durch die MLST wiedergespiegelt werden. Die Serotypisierung erfüllt somit nur noch zum Teil die Anforderungen an eine moderne und fundierte Methode zur epidemiologischen Untersuchung von *E. coli*-Isolaten.

Innerhalb dieser Arbeit führte die Anwendung einer neueren Methode zu einer verbesserten Modellvorstellung zur Diversität der ExPEC. In der Zukunft sind bei einer allgemeinen Weiterführung des Trends zur Anwendung von Methoden mit hohen Durchsatzraten, einhergehender drastischer Kostensenkungen und verbessertem Auflösungsvermögen, innerhalb des Fachgebietes der Mikrobiologie große Erkenntnisgewinne für die molekulare Epidemiologie und Mikroevolution bakterieller Pathogene zu erwarten.

7 Summary

The molecular epidemiology and microevolution of avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (APEC)

The extensive diversity of the species *Escherichia coli* is a tremendous challenge for the biologist focussing on bacterial phylogeny as well as for epidemiological interests in medicine and veterinary medicine. In this work different concepts for various problems of the genetic structure and microevolution of pathogens are presented, which can lead to a comprehensive insight into the relationship of strains inside the *E. coli*-population.

Bacterial subtyping is still an upcoming discipline and massively contributes to our understanding of disease epidemiology. Advantages and disadvantages of the different methods applied and their epidemiological interpretation are still disputed. Multilocus Sequence-Typing (MLST) and the introduction of sequence types (ST) is a phylogenetic technique which is based on the detection of differences in multiple conserved housekeeping-genes and is leading - together with powerful evaluation software – to an extensive classification scheme for highly diverse species.

In this study MLST was applied to a group of 151 extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). Diversity, epidemiological relationship and phylogenetic origins of these strains were still disputed. The selected isolates belonged to three different pathovars. Avian pathogenic *E. coli* (APEC) are causing septicaemia in birds - especially in poultry holdings - and constitute the main focus of this work. Furthermore, the phylogenetic relationships to uropathogenic *E. coli* (UPEC), as well as newborn-meningitis-associated *E. coli* (NMEC) in humans were examined. The ExPEC population structure was characterized by dichotomy. On the one hand single ExPEC-strains were dispersed all over the general *E. coli* population, on the other hand ExPEC accumulated at distinct phylogenetic clusters (ST-complex-95, -23 and -73, as well as ST117 and ST62). The clustered strains harboured significantly more virulence-associated genetic factors than the dispersed ones. Most of the analysed isolates were inside ST95. This ST included ExPEC of all three pathovars and was highly related to the expression of the capsular polysaccharide-type K1. This analysis ascertained the zoonotic potential of APEC – as a direct infective, as a reservoir for recurrently emerging clones, and as a distributor for virulence factors. Furthermore, the appearance of several phylogenetic groups in ExPEC showed the independent and parallel evolution in the course of millions of years. This could imply different pathogenic mechanism and different epidemiological behaviour of these pathogens.

MLST developed in the last years as a standard for phylogenetic analyses in *E. coli*. In a comprehensive comparison analysis with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) this study showed that both methods exhibit significant inconsistencies and are neither congruent nor supplement each other. The genetic fundament leading to this dataset for both methods consists to different degrees of single nucleotide polymorphism (SNP) and horizontal genetic exchange. PFGE is characterized by a high ability to discriminate between isolates and is useful for circumscribed outbreak analysis. However, it did not provide a basis for advanced classifications and extended phylogenetic studies.

Another method for differentiation on the sub-species level is the classification of bacterial taxa by antigenic structures into different serotypes. Using the example of the cell surface antigen (O-Antigen) it became obvious in this work that the phylogenetic background

of the carrier of the O-types showed considerable inconsistencies and in *E. coli* it was not always reflected by the results of the MLST. Thus, serotyping only partly complies with today's demands for a modern molecular typing method for *E. coli*-isolates.

The application of new methods in this work led to improved conceptions of the diversity of ExPEC. For the future, one can expect extensive insights into the molecular epidemiology and microevolution of bacterial pathogens through the trend towards methods with high throughput, drastic reduction in costs and improved resolution power.

8 Zitierte Literatur

- Achtman, M. (2002)
A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology.
In *Molecular Medical Microbiology*. Sussman, M. (ed).
London: Academic Press, pp. 485-509.
- Achtman, M. (2008)
Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens.
Annu Rev Microbiol 62: 53-70.
- Achtman, M., Heuzenroeder, M., Kusecek, B., Ochman, H., Caugant, D., Selander, R.K., Vaisanen-Rhen, V., Korhonen, T.K., Stuart, S., Orskov, F. and Orskov, I. (1986)
Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals.
Infect Immun 51: 268-76.
- Achtman, M., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A., and Silver, R.P. (1983)
Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates.
Infect Immun 39: 315-35.
- Afset, J.E., Anderssen, E., Bruant, G., Harel, J., Wieler, L., and Bergh, K. (2008)
Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis.
J Clin Microbiol 46: 2280-2290.
- Anjum, M.F., Lucchini, S., Thompson, A., Hinton, J.C., and Woodward, M.J. (2003)
Comparative genomic indexing reveals the phylogenomics of *Escherichia coli* pathogens.
Infect Immun 71: 4674-4683.
- Antao, E.M., Glodde, S., Li, G., Sharifi, R., Homeier, T., Laturus, C., Diehl, I., Bethe, A., Philipp, H.C., Preisinger, R., Wieler, L.H., and Ewers, C. (2008)
The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).
Microb Pathog. 45: 361-369.
- Applied Maths BVBA (2006)
Bionumerics. The integral study of biological relationships.
Manual Version 4 7: 39-66.
- Bahrani-Mougeot, F.K., Buckles, E.L., Lockatell, C.V., Hebel, J.R., Johnson, D.E., Tang, C.M., and Donnenberg, M.S. (2002)
Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract.
Mol Microbiol 45: 1079-93.
- Ballmer, K., Korczak, B.M., Kuhnert, P., Slickers, P., Ehricht, R., and Hachler, H. (2007)
Fast DNA serotyping of *Escherichia coli* by use of an oligonucleotide microarray.
J Clin Microbiol 45: 370-379.

- Beutin, L., Kaulfuss, S., Herold, S., Oswald, E., and Schmidt, H. (2005)
Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis.
J Clin Microbiol 43: 1552-63.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., and Denamur, E. (1998)
Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains.
J Infect Dis 177: 642-650.
- Blattner, F.R., Plunkett, G.3., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997)
The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.
Science 277: 1453-74.
- Boyd, E.F., and Hartl, D.L. (1998)
Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution.
J Bacteriol 180: 1159-65.
- Brzuszkiewicz, E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2006)
How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains.
Proc Natl Acad Sci U S A 103: 12879-84.
- Carvalho de Moura, A.C., Irino, K., and Vidotto, M.C. (2001)
Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction.
Avian Dis 45: 173-81.
- Charleston, M.A. (1998)
Jungles: a new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem.
Math Biosci 149: 191-223.
- Chen, S.L., Hung, C.S., Xu, J., Reigstad, C.S., Magrini, V., Sabo, A., Blasiar, D., Bieri, T., Meyer, R.R., Ozersky, P., Armstrong, J.R., Fulton, R.S., Latreille, J.P., Spieth, J., Hooton, T.M., Mardis, E.R., Hultgren, S.J., and Gordon, J.I. (2006)
Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach.
Proc Natl Acad Sci U S A 103: 5977-82.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000)
Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.
Appl Environ Microbiol 66: 4555-4558.
- Clermont, O., Johnson, J.R., Menard, M., and Denamur, E. (2006)
Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia.
Diagn Microbiol Infect Dis. 57: 129-136.

- Dho-Moulin, M., and Fairbrother, J.M. (1999)
Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).
Vet Res 30: 299-316.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Ure, R., Wagenaar, J.A., Duim, B., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R., and Maiden, M.C. (2002)
Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation.
Emerg Infect Dis 8: 949-955.
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., Svanborg, C., Gottschalk, G., Karch, H., and Hacker, J. (2003)
Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays.
J Bacteriol 185: 1831-40.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G., and Hacker, J. (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: 6365-72.
- Dobrindt, U., and Hacker, J. (2001)
Whole genome plasticity in pathogenic bacteria.
Curr Opin Microbiol 4: 550-7.
- Dozois, C.M., Chanteloup, N., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., and Fairbrother, J.M. (1994)
Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*.
Avian Dis 38: 231-239.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., and Curtiss, R.3. (2000)
Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *Tsh* genetic region.
Infect Immun 68: 4145-54.
- Dozois, C.M., Pourbakhsh, S.A., and Fairbrother, J.M. (1995)
Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry.
Vet Microbiol 45: 297-309.
- Dunbar, S.A., Vander Zee, C.A., Oliver, K.G., Karem, K.L., and Jacobson, J.W. (2003)
Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system.
J Microbiol Methods 53: 245-252.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., and Spratt, B.G. (2002)
The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).
Proc Natl Acad Sci U S A 99: 7687-7692.
- Enright, M.C., and Spratt, B.G. (1999)
Multilocus sequence typing.
Trends in Microbiology 7: 482-487.

- Escherich, T. (1885)
Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings.
Fortschritte in der Medizin 515–522; 547–554.
- Ewers, C., Janssen, T., and Wieler, L.H. (2003)
Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).
Berl Munch Tierarztl Wochenschr 116: 381-395.
- Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C., and Wieler, L.H. (2004a)
Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry.
Vet Microbiol 104: 91-101.
- Ewers, C., Schuffner, C., Weiss, R., Baljer, G., and Wieler, L.H. (2004b)
Molecular characteristics of *Escherichia coli* serogroup O78 strains isolated from diarrheal cases in bovines urge further investigations on their zoonotic potential.
Molecular Nutrition & Food Research 48: 504-514.
- Ewers, C., Li, G.W., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E.M., Laternus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Philipp, H.C., and Wieler, L.H. (2007)
Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?
International Journal of Medical Microbiology 297: 163-176.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J.K. (2003)
Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies.
Genetics 164: 1567-87.
- Feng, P.C., Monday, S.R., Lacher, D.W., Allison, L., Siitonen, A., Keys, C., Eklund, M., Nagano, H., Karch, H., Keen, J., and Whittam, T.S. (2007)
Genetic diversity among clonal lineages within *Escherichia coli* O157:H7 stepwise evolutionary model.
Emerg Infect Dis 13: 1701-1706.
- Filliol, I., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Qi, W., Hazbon, M.H., Bobadilla, d., V, Fyfe, J., Garcia-Garcia, L., Rastogi, N., Sola, C., Zozio, T., Guerrero, M.I., Leon, C.I., Crabtree, J., Angiuoli, S., Eisenach, K.D., Durmaz, R., Joloba, M.L., Rendon, A., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de, L.A., Cave, M.D., Fleischmann, R., Whittam, T.S., and Alland, D. (2006)
Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set.
J Bacteriol 188: 759-772.
- Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997)
Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine.
Nature 387: 729-733.
- Gerner-Smidt, P., Hise, K., Kincaid, J., Hunter, S., Rolando, S., Hyytia-Trees, E., Ribot, E.M., and Swaminathan, B. (2006)
PulseNet USA: a five-year update.
Foodborne Pathog Dis 3: 9-19.

- Groisman, E.A., and Ochman, H. (1996)
Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps.
Cell 87: 791-794.
- Gross, W.B. (1994)
Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In *Escherichia coli*
in domestic animals and humans.
Gyles C.L. (ed). Wallingford, UK, pp. 237-259.
- Guttman, D.S., and Dykhuizen, D.E. (1994)
Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation.
Science 266: 1380-3.
- Hacker, J. (1992)
Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections.
Can J Microbiol 38: 720-727.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000)
Pathogenicity islands and the evolution of microbes.
Annu Rev Microbiol 54: 641-79.
- Hacker, J., and Carniel, E. (2001)
Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the
evolution of microbes.
EMBO Rep 2: 376-81.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Hochhut, B., and Dobrindt, U. (2003)
The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic
elements. A review.
Acta Microbiol Immunol Hung 50: 321-30.
- Hahn, H., Falke, A., Kaufmann, S.H., and Ullmann, R. (2004)
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie Springer.
- Harmsen, D., Dostal, S., Roth, A., Niemann, S., Rothganger, J., Sammeth, M., Albert, J.,
Frosch, M., and Richter, E. (2003)
RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium*
species.
BMC Infect Dis 3: 26.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G.,
Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda,
T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., and
Shinagawa, H. (2001)
Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic
comparison with a laboratory strain K-12.
DNA Res 8: 11-22.
- Hilali, F., Ruimy, R., Saulnier, P., Barnabe, C., Lebouguenec, C., Tibayrenc, M., and
Andremont, A. (2000)
Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia
in cancer patients.
Infect Immun 68: 3983-3989.

- Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., and Hacker, J. (2006)
Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536.
Mol Microbiol 61: 584-95.
- Honsa, E., Fricke, T., Stephens, A.J., Ko, D., Kong, F., Gilbert, G.L., Huygens, F., and Giffard, P.M. (2008)
Assignment of *Streptococcus agalactiae* isolates to clonal complexes using a small set of single nucleotide polymorphisms.
BMC Microbiol 8: 140.
- Horne, S.M., Pfaff-McDonough, S.J., Giddings, C.W., and Nolan, L.K. (2000)
Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*.
Avian Dis 44: 179-84.
- Houdouin, V., Bonacorsi, S., Brahimi, N., Clermont, O., Nassif, X., and Bingen, E. (2002)
A uropathogenicity island contributes to the pathogenicity of *Escherichia coli* strains that cause neonatal meningitis.
Infect Immun 70: 5865-9.
- Huang, S.H., Wass, C., Fu, Q., Prasadarao, N.V., Stins, M., and Kim, K.S. (1995)
Escherichia coli invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*.
Infect Immun 63: 4470-4475.
- Janke, B., Dobrindt, U., Hacker, J., and Blum-Oehler, G. (2001)
A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655.
FEMS Microbiol Lett 199: 61-6.
- Janssen, T. (2002)
Molekulare epidemiologische Untersuchungen aviärer pathogener *Escherichia coli* (APEC) - Wildtypstämme und Etablierung einer diagnostischen Multiplex-PCR.
Dissertation Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin
- Janssen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H.C., and Wieler, L.H. (2001)
Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis.
Int J Med Microbiol 291: 371-8.
- Johanson, I., Lindstedt, R., and Svanborg, C. (1992)
Roles of the *pap*- and *prs*-encoded adhesins in *Escherichia coli* adherence to human uroepithelial cells.
Infect Immun 60: 3416-22.
- Johnson, J.R., Owens, K.L., Clabots, C.R., Weissman, S.J., and Cannon, S.B. (2006)
Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis.
Microbes Infect 8: 1702-13.
- Johnson, J.R., and Kuskowski, M. (2000)
Clonal origin, virulence factors, and virulence.
Infect Immun 68: 424-425.

- Johnson, J.R., and Stell, A.L. (2000)
Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.
J Infect Dis 181: 261-72.
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Johnson, S.J., Stell, A.L., Doetkott, C., Johnson, J.R., Kim, K.S., Spanjaard, L., and Nolan, L.K. (2008)
Comparison of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens.
Appl Environ Microbiol. (published online ahead of print)
- Kaper, J.B., and Karmali, M.A. (2008)
The continuing evolution of a bacterial pathogen.
Proc Natl Acad Sci U S A 105: 4535-4536.
- Karch, H., Schmidt, H., Janetzki-Mittmann, C., Scheef, J., and Kroger, M. (1999)
Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages.
Mol Gen Genet 262: 600-7.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., and Achtman, M. (2002)
Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old.
Infect Genet Evol 2: 39-45.
- Kim, K.S. (2001)
Escherichia coli translocation at the blood-brain barrier.
Infect Immun 69: 5217-22.
- Kimura, M. (1980)
A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.
J Mol Evol 16: 111-120.
- Kleta, S., Steinruck, H., Breves, G., Duncker, S., Laturus, C., Wieler, L.H., and Schierack, P. (2006)
Detection and distribution of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in Germany.
J Appl Microbiol 101: 1357-66.
- Krause, U., Thomson-Carter, F.M., and Pennington, T.H. (1996)
Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing.
J Clin Microbiol 34: 959-961.
- Kurazono, H., Nakano, M., Yamamoto, S., Ogawa, O., Yuri, K., Nakata, K., Kimura, M., Makino, S., and Nair, G.B. (2003)
Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island.
Microbiol Immunol 47: 797-802.

- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., and Tenailon, O. (2007)
Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains.
Mol Biol Evol 24: 2373-2384.
- Levine, M.M., and Rennels, M.B. (1978)
E. coli colonisation factor antigen in diarrhoea.
Lancet 2: 534.
- Li, G., Laturus, C., Ewers, C., and Wieler, L.H. (2005)
Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis.
Infect Immun 73: 2818-27.
- Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J., and Goebel, W. (1996)
Analysis of the in vivo activation of hemolysin (*HlyA*) from *Escherichia coli*.
J Bacteriol 178: 5422-5430.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., and Spratt, B.G. (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: 3140-5.
- Manges, A.R., Smith, S.P., Lau, B.J., Nuval, C.J., Eisenberg, J.N., Dietrich, P.S., and Riley, L.W. (2007)
Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study.
Foodborne Pathog Dis 4: 419-31.
- Manning, S.D., Motiwala, A.S., Springman, A.C., Qi, W., Lacher, D.W., Ouellette, L.M., Mladonicky, J.M., Somsel, P., Rudrik, J.T., Dietrich, S.E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D., and Whittam, T.S. (2008)
Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks.
Proc Natl Acad Sci U S A 105: 4868-4873.
- Martiny, J.B., Bohannan, B.J., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreas, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., and Staley, J.T. (2006)
Microbial biogeography: putting microorganisms on the map.
Nat Rev Microbiol 4: 102-12.
- May, M., Daley, A.J., Donath, S., and Isaacs, D. (2005)
Early onset neonatal meningitis in Australia and New Zealand, 1992-2002.
Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 90: 324-7.
- Maynard Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M., and Spratt, B.G. (1993)
How clonal are bacteria?
Proc Natl Acad Sci U S A 90: 4384-8.
- Maynard-Smith, J., and Smith, N.H. (1998)
Detecting recombination from gene trees.
Mol Biol Evol 15: 590-9.

- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C.M., Curtiss, R.3., Brown, P.K., Arne, P., Bree, A., Desautels, C., and Fairbrother, J.M. (2003)
Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity.
Infect Immun 71: 536-40.
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., Kock, R., Friedrich, A.W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M.A., and Karch, H. (2008)
Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
Emerg Infect Dis 14: 1287-1290.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., and Hacker, J. (2004)
Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536.
J Bacteriol 186: 3086-96.
- Mora, M., Donati, C., Medini, D., Covacci, A., and Rappuoli, R. (2006)
Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach.
Curr Opin Microbiol 9: 532-536.
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M.R., Bree, A., Germon, P., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, M., and Blanco, J. (2006)
Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin.
J Clin Microbiol 44: 3484-92.
- Moulin-Schouleur, M., Reperant, M., Laurent, S., Bree, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., and Schouler, C. (2007)
Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns.
J Clin Microbiol 45: 3366-3376.
- Mühlendorfer, I., and Hacker, J. (1994)
Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence.
Microb Pathog 16: 171-181.
- Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J., and Hultgren, S.J. (2000)
Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses.
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8829-35.
- Neilands, J.B. (1992)
Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30).
Can J Microbiol 38: 728-733.
- Nemoy, L.L., Kotetishvili, M., Tigno, J., Keefer-Norris, A., Harris, A.D., Perencevich, E.N., Johnson, J.A., Torpey, D., Sulakvelidze, A., Morris, J.G., Jr., and Stine, O.C. (2005)
Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates.
J Clin Microbiol 43: 1776-81.

- Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Canica, M.M., Park, Y.J., Lavigne, J.P., Pitout, J., and Johnson, J.R. (2008)
Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15.
J Antimicrob Chemother 61: 273-281.
- Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Stine, O.C., Morris, J.G., Jr., Boxrud, D.J., Dixon, B., and Harrison, L.H. (2003)
Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis.
J Clin Microbiol 41: 675-679.
- Ochman, H., and Selander, R.K. (1984a)
Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*.
Proc Natl Acad Sci U S A 81: 198-201.
- Ochman, H., and Selander, R.K. (1984b)
Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations.
J Bacteriol 157: 690-3.
- Orskov, F., Orskov, I., Evans, D.J., Jr., Sack, R.B., Sack, D.A., and Wadstrom, T. (1976)
Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children.
Med Microbiol Immunol (Berl) 162: 73-80.
- Orskov, F., and Orskov, I. (1975)
Escherichia coli O:H serotypes isolated from human blood. Prevalence of the K1 antigen with technical details of O and H antigenic determination.
Acta Pathol Microbiol Scand Suppl 83: 595-600.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., and Jann, K. (1977)
Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*.
Bacteriol Rev 41: 667-710.
- Pearl, D.L., Louie, M., Chui, L., Dore, K., Grimsrud, K.M., Martin, S.W., Michel, P., Svenson, L.W., and McEwen, S.A. (2007)
The use of randomization tests to assess the degree of similarity in PFGE patterns of *E. coli* O157 isolates from known outbreaks and statistical space-time clusters.
Epidemiol Infect 135: 100-109.
- Pearson, T., Busch, J.D., Ravel, J., Read, T.D., Rhoton, S.D., U'Ren, J.M., Simonson, T.S., Kachur, S.M., Leadem, R.R., Cardon, M.L., Van Ert, M.N., Huynh, L.Y., Fraser, C.M., and Keim, P. (2004)
Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing.
Proc Natl Acad Sci U S A 101: 13536-41.
- Perna, N.T., Plunkett, G.3., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., and Blattner, F.R. (2001)
Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
Nature 409: 529-33.

- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., and Denamur, E. (1999)
The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection.
Infect Immun 67: 546-553.
- Popoff, M.Y., and Le Minor, L. (2001)
Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, 2001.
- Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S., and Sack, R.B. (2005)
Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention.
Clin Microbiol Rev 18: 465-483.
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K., and Whittam, T.S. (2000)
Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*.
Nature 406: 64-7.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M.B., Berlyn, M.K., Blattner, F.R., Chaudhuri, R.R., Glasner, J.D., Horiuchi, T., Keseler, I.M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N.T., Plunkett, G.3., Rudd, K.E., Serres, M.H., Thomas, G.H., Thomson, N.R., Wishart, D., and Wanner, B.L. (2006)
Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005.
Nucleic Acids Res 34: 1-9.
- Roberts, J.A. (1996)
Tropism in bacterial infections: urinary tract infections.
J Urol 156: 1552-1559.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K., and Nolan, L.K. (2005)
Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis.
Microbiology 151: 2097-110.
- Roumagnac, P., Weill, F.X., Dolecek, C., Baker, S., Brisse, S., Chinh, N.T., Le, T.A., Acosta, C.J., Farrar, J., Dougan, G., and Achtman, M. (2006)
Evolutionary history of *Salmonella typhi*.
Science 314: 1301-1304.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., and Rozas, R. (2003)
DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods.
Bioinformatics 19: 2496-7.
- Schierack, P., Walk, N., Ewers, C., Wilking, H., Steinruck, H., Filter, M., and Wieler, L.H. (2008)
ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group.
Environ Microbiol 10: 1742-1751.
- Schlager, T.A., Hendley, J.O., Bell, A.L., and Whittam, T.S. (2002)
Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls.
Infect Immun 70: 1225-9.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., and Karch, H. (2000)
A new Shiga toxin 2 variant (*Stx2f*) from *Escherichia coli* isolated from pigeons.
Appl Environ Microbiol 66: 1205-8.

- Selander, R.K., Caugant, D.A., and Ochman, H. (1986a)
Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.
Applied and Environmental Microbiology 51: 873-884.
- Selander, R.K., Korhonen, T.K., Vaisanen-Rhen, V., Williams, P.H., Pattison, P.E., and Caugant, D.A. (1986b)
Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis.
Infect Immun 52: 213-22.
- Selander, R.K., Musser, J.M., Caugant, D.A., Gilmour, M.N., and Whittam, T.S. (1987)
Population genetics of pathogenic bacteria.
Microb Pathog 3: 1-7.
- Selander, R.K., and Levin, B.R. (1980)
Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations.
Science 210: 545-7.
- Service, R.F. (2006)
Gene sequencing. The race for the \$1000 genome.
Science 311: 1544-6.
- Silver, R.P., Finn, C.W., Vann, W.F., Aaronson, W., Schneerson, R., Kretschmer, P.J., and Garon, C.F. (1981)
Molecular cloning of the K1 capsular polysaccharide genes of *E. coli*.
Nature 289: 696-8.
- Songer, J.G., and Post, K.W. (2007)
Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease.
Elsevier Saunders
- Spratt, B.G. (2004)
Exploring the concept of clonality in bacteria.
Methods Mol Biol 266: 323-52.
- Spratt, B.G., and Maiden, M.C. (1999)
Bacterial population genetics, evolution and epidemiology.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 354: 701-710.
- Staden, R. (1996)
The Staden sequence analysis package.
Mol Biotechnol 5: 233-241.
- Stoll, B.J. (1997)
The global impact of neonatal infection.
Clin Perinatol 24: 1-21.
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., and Tauxe, R.V. (2001)
PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States.
Emerg Infect Dis 7: 382-9.
- Syvanen, A.C. (2001)
Assessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms.
Nature Reviews Genetics 2: 930-942.

- Tartof, S.Y., Solberg, O.D., Manges, A.R., and Riley, L.W. (2005)
Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing.
J Clin Microbiol 43: 5860-5864.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995)
Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.
J Clin Microbiol 33: 2233-2239.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., and Goering, R.V. (1997)
How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America.
Infect Control Hosp Epidemiol 18: 426-39.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de, B., I, Noordhuizen, J.P., and Frankena, K. (2001)
WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine.
Vet Rec 148: 567-572.
- Tullus, K., Brauner, A., Frykland, B., Munkhammar, T., Rabsch, W., Reissbrodt, R., and Burman, L.G. (1992)
Host factors versus virulence-associated bacterial characteristics in neonatal and infantile bacteraemia and meningitis caused by *Escherichia coli*.
J Med Microbiol 36: 203-208.
- Urwin, R., and Maiden, M.C. (2003)
Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology.
Trends Microbiol 11: 479-487.
- Vahlne, G. (1945)
Serological Typing of the Colon Bacteria.
Acta Pathol Microbiol Scand Suppl 62: 1-127.
- Vandemaele, F., Assadzadeh, A., Derijcke, J., Vereecken, M., and Goddeeris, B.M. (2002)
Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC).
Tijdschr Diergeneeskd 127: 582-588.
- Wang, L., and Reeves, P.R. (1998)
Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes.
Infect Immun 66: 3545-3551.
- Watt, S., Lanotte, P., Mereghetti, L., Moulin-Schouleur, M., Picard, B., and Quentin, R. (2003)
Escherichia coli strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors.
J Clin Microbiol 41: 1929-35.
- Weissman, S.J., Chattopadhyay, S., Aprikian, P., Obata-Yasuoka, M., Yarova-Yarovaya, Y., Stapleton, A., Ba-Thein, W., Dykhuizen, D., Johnson, J.R., and Sokurenko, E.V. (2006)
Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.
Mol Microbiol 59: 975-88.

- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G.3., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L., Donnenberg, M.S., and Blattner, F.R. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*.
Proc Natl Acad Sci U S A 99: 17020-4.
- Whittam, T.S. (1996) Genetic variation and evolutionary processes in natural populations of *E. coli*. In *Escherichia and Salmonella cellular and molecular biology*. Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S. et al. (eds). Washington (DC): American Society of Microbiologists, pp. 2708-2720.
- Whittam, T.S., Reid, S.D., and Selander, R.K. (1998) Mutators and long-term molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg Infect Dis* 4: 615-617.
- Whittam, T.S., Wolfe, M.L., Wachsmuth, I.K., Orskov, F., Orskov, I., and Wilson, R.A. (1993) Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* 61: 1619-29.
- Wieler, L.H., Vieler, E., Erpenstein, C., Schlapp, T., Steinruck, H., Bauerfeind, R., Byomi, A., and Baljer, G. (1996) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J Clin Microbiol* 34: 2980-4.
- Wilde, C., Mazel, D., Hochhut, B., Middendorf, B., Le Roux, F., Carniel, E., Dobrindt, U., and Hacker, J. (2008) Delineation of the recombination sites necessary for integration of pathogenicity islands II and III into the *Escherichia coli* 536 chromosome. *Mol Microbiol* 68: 139-151.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., and Achtman, M. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60: 1136-1151.
- Woodford, N. (2008) Successful, multiresistant bacterial clones. *J Antimicrob Chemother* 61: 233-234.
- Xie, Y., Kolisnychenko, V., Paul-Satyaseela, M., Elliott, S., Parthasarathy, G., Yao, Y., Plunkett, G.3., Blattner, F.R., and Kim, K.S. (2006) Identification and Characterization of *Escherichia coli* RS218-Derived Islands in the Pathogenesis of *E. coli* Meningitis. *J Infect Dis* 194: 358-64.
- Yao, Y., Xie, Y., and Kim, K.S. (2006) Genomic comparison of *Escherichia coli* K1 strains isolated from the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Infect Immun* 74: 2196-206.

- Zdziarski, J., Svanborg, C., Wullt, B., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2008)
Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation?
Infect Immun 76: 695-703.
- Zhang, W., Mellmann, A., Sonntag, A.K., Wieler, L., Bielaszewska, M., Tschäpe, H., Karch, H., and Friedrich, A.W. (2007)
Structural and functional differences between disease-associated genes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111.
Int J Med Microbiol 297: 17-26.
- Zhu, P., van der Ende, A., Falush, D., Brieske, N., Morelli, G., Linz, B., Popovic, T., Schuurman, I.G., Adegbola, R.A., Zurth, K., Gagneux, S., Platonov, A.E., Riou, J.Y., Caugant, D.A., Nicolas, P., and Achtman, M. (2001)
Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis.
Proc Natl Acad Sci U S A 98: 5234-5239.

9 Publikationsverzeichnis

Vorträge und Poster

Wilking,H., Ewers,C., Achtman,M., and Wieler,L.H.

Relational analysis of avian pathogenic *E. coli*, uropathogenic *E. coli* and newborn meningitis causing *E. coli* by means of Multilocus Sequence Typing.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.(DVG) Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie Wetzlar, 14. - 17. 06. 2006 Abstrakt in: Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120(1-2), 2007 . 05. 06. 2006.

Ewers,C., Wilking,H., Kiessling,S., Antao,E.M., Diehl,I., Laternus,C., Li,G.W., Glodde,S., Homeier,T. and Wieler,L.H.

Virulence gene pattern of avian pathogenic, uropathogenic and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: How closely related are they?

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.(DVG) Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie Wetzlar, 14.-17. 06. 2006 Abstrakt in: Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (1-2), 2007 . 15. 06. 2006.

Wieler,L.H., Wilking,H., und Ewers,C.

Molekulare Typisierung von Bakterien am Beispiel der schwach klonalen *E. coli*: Was ist zu beachten?

Institutskolloquium Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, 04. 04. 2006.

Ewers,C., Li,G.W., Bohnke,U., Homeier,T., Kiessling,S., Diehl,I., Wilking,H., Philipp,H.C., und Wieler,L.H.

Aviäre Pathogene *Escherichia coli*.

Tagung der DVG-Fachgruppe Geflügelkrankheiten Hannover. 18. 05. 2006.

Wilking,H., Ewers,C., and Wieler,L.H.

Bacterial population modelling reveals a close relationship between avian pathogenic *E. coli* (APEC) urinary pathogenic *E. coli* (UPEC) and newborn meningitis causing *E. coli* (NMEC). Shanghai Jiao Tong University, College of Veterinary Medicine Shanghai/ People's Republic of China. 24. 10. 2006.

Wilking,H., Ewers,C., and Wieler,L.H.

Bacterial population modelling reveals a close relationship between avian pathogenic *E. coli* (APEC) urinary pathogenic *E. coli* (UPEC) and newborn meningitis causing *E. coli* (NMEC). Nanjing Agricultural University, College of Veterinary Medicine Nanjing/ People's Republic of China.

27. 10. 2006.

Wilking,H., Ewers,C., Achtman,M., and Wieler,L.H.

Bands vs. bases: A critical view on clonal analyses in *Escherichia coli*.

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM).Göttingen, Int.J.Med.Microbiol.297 (S) 297, 145. 30. 10. 2007.

Aktan,I., Carter,B., Wilking,H., La Ragione,R.M., Woodward,M.J., Wieler,L.H., and Anjum,M.F.

Escherichia coli O26 strains: influence of geography, host animal and *stx* gene on virulence characteristics.

59. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Göttingen, 30.09.-4.10.2007 Int.J.Med.Microbiol.297 (S1) 297, 54. 30-10-2007.

Ewers,C., Wilking,H., Achtman,M., and Wieler,L.H.

Phylogenetic analysis of extraintestinal *E. coli* (ExPEC) reveals a close relationship between isolates of human and animal origin, urging a zoonotic potential of distinct phylotypes.

Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Jahrestagung 2007 297, 148. 30-10-2007a.

Ewers,C., Wilking,H., Homeier,T., Achtman,M., and Wieler,L.H.

Phylogenetic analysis of extraintestinal *E. coli* (ExPEC) reveals a close relationship between isolates of human and animal origin, urging a zoonotic potential of distinct phylotypes.

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.(DGHM) Göttingen, 30.09.- 04.10.2007 Int.J.Med.Microbiol.297 . 3-10-2007c.

Ewers,C., Wilking,H., Homeier,T., Achtman,M., and Wieler,L.H.

Extraintestinal *E. coli* (ExPEC) from various hosts share identical phylotypes, indicating their zoonotic potential.

EMBO-FEMS-Leopoldina Symposium "*Escherichia coli* - facets of a versatile pathogen". Kloster Banz, Bad Staffelstein 09.10. - 12.10.2007.

Schierack,P., Walk,N., Ewers,C., Filter,M., Wilking,H., and Wieler,L.H.

ExPEC-typical virulence associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group.

Tagung der Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG). Braunschweig, 25.06. - 27.06.2008.

B: Angenommene Originalarbeiten in Zeitschriften mit Gutachtersystem

Aktan,I., Carter,B., Wilking,H., La Ragione,R.M., Wieler,L., Woodward,M.J., and Anjum,M.F. (2007)

Influence of geographical origin, host animal and *stx* gene on the virulence characteristics of *Escherichia coli* O26 strains.

Journal of Medical Microbiology 56: 1431-1439.

Ewers,C., Li,G.W., Wilking,H., Kiessling,S., Alt,K., Antao,E.M. and Wieler,L.H. (2007)

Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?

International Journal of Medical Microbiology 297: 163-176.

Schierack,P., Walk,N., Ewers,C., Wilking,H., Steinrück,H., Filter,M., and Wieler,L.H. (2008)

ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group.

Environmental Microbiology 10: 1742-1751.

10 Danksagung

Die Konzipierung einer Doktorarbeit ist nicht als „Einzeltäter“ möglich und sowohl die Arbeit im Labor, als auch die Anfertigung der Dissertation ist nur in einer „klonalen“ Gruppe von Menschen möglich. Zunächst möchte ich natürlich meinem Doktorvater Professor Wieler danken auf dessen Initiative diese Arbeit entstanden ist. Er hat als Direktor des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) einen exzellenten Rahmen geschaffen, um wissenschaftlich kreativ zu sein und eigene Ideen umzusetzen. Besonders die Förderung der Kontakte zu benachbarten mikrobiologischen Forschungseinrichtungen und zu den Forschungsgesellschaften war wichtig und haben mir stets geholfen meine Arbeit weiterzuentwickeln. Den Gutachtern danke ich für die Beurteilung meiner Arbeit. Frau Dr. Christa Ewers war meine Betreuerin bei dieser Dissertation und war immer zur Stelle, um mir bei den vielen kleinen Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgetaucht sind, hilfreich zu unterstützen. Prof. Preisinger und Dr. Philipp von der Lohmann Tierzucht GmbH möchte ich für die Finanzierung dieser Arbeit herzlich danken. Ohne diese Unterstützung hätte ich mich nicht in dieser Intensität mit dem Thema beschäftigen können. Speziell die Laborarbeit ist nur in einem Team möglich und innerhalb der Arbeitsgruppe „Infektionsbiologie und Phylogenie bakterieller Pathogene (IPP)“ am IMT wurde ich immer gut unterstützt. Die Arbeitsgruppe „Infektionsdiagnostik und molekulare Epidemiologie (IME)“ und speziell Mirjam Grobbel haben mir bei der Stammhaltung der Bakterien sehr geholfen.

Meine Mutter Maria Wilking und mein Vater Dr. Eduard Wilking sind stets ein sicherer „Hafen“ in meinem Leben und auch während dieser Arbeit habe ich enorm viel Unterstützung erhalten und einen warmen Rückhalt erfahren. Meine Freundin Sandra nimmt einen großen Platz in meinem Herzen ein und ohne Ihre Liebe und Unterstützung hätte ich nicht so viel Freude an meiner Arbeit.

11 Selbständigkeitserklärung

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

Berlin der 02. Juli 2009

Hendrik Wilking