

Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

**Molekularbiologische Untersuchungen
von *Escherichia-coli*-Stuhl- und Urin-Isolaten
von Patientinnen mit chronisch-rezidivierenden Harnwegsinfektionen
hinsichtlich ihrer Persistenz und Genomstruktur**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Alexander Hoffmann-Wolz
aus Bad Brückenau

Würzburg, Juli 2007

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Reidl

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2008

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.A Harnwegsinfektionen (HWI)	1
1. Definition	1
2. Epidemiologie	1
3. Ätiologie (Infektionsweg, Risikofaktoren, Erregerspektrum)	1
4. Klinische Einteilung und Formen	3
4.1. Asymptomatische Bakteriurie (ABU)	4
4.2 Symptomatische Harnwegsinfektionen	4
5. Diagnose	5
6. Therapie	6
7. Prognose	6
I.B <i>Escherichia coli</i>	7
1. Einteilung	7
2. Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC)	7
2.1. Pathogenitätsfaktoren von UPEC	8
2.2. Wirtsfaktoren für UPEC	14
2.3. Prävention von UPEC-Infektionen	17
I.C Ziele dieser Arbeit	18
II. Materialien	19
II.A Geräte	19
II.B Verbrauchsmaterialien	20
II.C Chemikalien und Reagenzien	20
II.D Medien und Agarplatten	21
II.E Puffer und Lösungen	23
II.F Bakterienstämme	25
II.G Oligonukleotide	26
II.H Größenmarker	28
III. Methoden	30
III.A Vorarbeiten	30
III.B Phänotypische Untersuchungen	31
1. Nachweis von α -Hämolysin	31

Inhaltsverzeichnis

2. Nachweis von P-Fimbrien	31
3. Nachweis von S-Fimbrien	32
4. Nachweis von Typ-1-Fimbrien	32
III.C Genotypische Untersuchungen	32
1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2. Agarosegelelektrophorese	37
3. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	38
IV. Ergebnisse.....	41
IV.A Einführung.....	41
IV.B Auswertung der einzelnen Patientinnen	44
Einführung zu „Phänotypische und genotypische Ergebnisse“	44
Einführung zu „Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse“	45
Einführung zu „Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor“	47
1. Patientin 1 (CB)	48
1.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	49
1.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	51
1.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	55
2. Patientin 2 (HF)	56
2.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	57
2.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	59
2.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	63
3. Patientin 3 (CG).....	64
3.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	65
3.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	67
3.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	71
4. Patientin 5 (EM).....	72
4.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	73
4.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	75
4.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	78
5. Patientin 8 (US)	79
5.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	80
5.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	82
5.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	86
6. Patientin 11 (SH)	87

6.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	88
6.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	89
6.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	92
7. Patientin 22 (IH).....	93
7.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	94
7.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	95
7.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	98
8. Patientin 29 (SJ).....	99
8.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse	100
8.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse	102
8.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor	104
IV.C Auswertung patientenübergreifender Daten.....	105
1. Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren der Isolate	105
2. Häufigkeiten genotypischer Faktoren der Klone	106
3. Genkombinationen innerhalb aller Klone nach ihrer Herkunft	107
4. Klone während klinisch aktiver Phasen.....	111
5. Pathogenitätsfaktoren und Genkombinationen innerhalb der Klone bei Patientinnen mit und ohne Acimethin®-Therapie.....	112
V. Diskussion.....	117
V.A Häufigkeiten der Virulenzfaktoren	118
V.B Genkombinationen	122
V.C Persistenzen von <i>E. coli</i> Stämmen	126
V.D DNA-Umlagerungen.....	130
V.E Klinische Aktivität	131
V.F Einfluß der Acimethin®-Therapie.....	133
VI. Zusammenfassung	135
VII. Literaturverzeichnis.....	137
VIII. Anhang.....	147

Inhaltsverzeichnis

Lebenslauf

Ehrenwörtliche Erklärung

Danksagung

I. Einleitung

I.A Harnwegsinfektionen (HWI)

1. Definition

Unter einer Harnwegsinfektion (HWI) versteht man die Präsenz und Vermehrung von infektiösen Erregern im Harntrakt mit Folge einer Entzündungsreaktion. Der Harntrakt gliedert sich in einen unteren und oberen Teil. Der untere Teil umfaßt Blase und Harnröhre (Urethra), der obere Teil Nieren mit Nierenbecken (Pyelon) und Harnleiter (Ureter) (Classen et al., 1998). Die Abbildung I.1 zeigt den menschlichen Harntrakt.

2. Epidemiologie

Harnwegsinfektionen gehören zu den häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen überhaupt, sowohl in Arztpraxen wie auch als nosokomiale (im Krankenhaus erworbene) Begleiterkrankungen (Classen et al., 1998). Jede zweite Frau erkrankt mindestens einmal in ihrem Leben an einer Zystitis (Harnblasenentzündung), was der häufigste Grund für Arbeitsunfähigkeit bei Frauen ist. Bei Frauen nimmt die Prävalenz generell mit dem Lebensalter zu, bei Männern werden HWI zu allermeist in höherem Lebensalter diagnostiziert (Obstruktion durch Prostatavergrößerung und Restharnbildung) (Herold et al., 2001). Ab dem 65. Lebensjahr ist eine symptomlose Bakteriurie häufig (bei Frauen bis zu 20 %, bei Männern bis zu 10 %), wobei die Mortalität erst bei zusätzlich bestehenden Begleiterkrankungen erhöht ist (Johnson, 1991b; Agace et al., 1996; Warren, 1996).

Bei Kindern kommt es oft aufgrund angeborener Anomalien zu Erkrankungen. Bei bis zu 50 % aller Kinder (bis zum 5. Lebensjahr) mit einer Bakteriurie, kann ein sog. vesikoureteraler Reflux (VUR) festgestellt werden. Bei dieser Anomalie ist die Einmündung des Harnleiters in die Harnblase zu weit geraten, so daß es zum Rückfluß von Harn in Richtung Niere(n) kommt.

3. Ätiologie (Infektionsweg, Risikofaktoren, Erregerspektrum)

Der Infektionsweg ist in 98 % der Fälle ascendierend und nur in 2 % hämatogen (Herold et al., 2001). Alken und Walz (1998) geben 80 - 90 % als Häufigkeit für ascendierende Urogenitalinfektionen an. Hauptsächlich der Darm mit seiner residenten (lange ortsansässigen) und transienten (kurzzeitig ansässigen) Flora fungiert als Erregerreservoir. Auch die Flora der Vagina und der periurethralen Region spielt eine Rolle (Agace et al., 1996). Rezidivierende Infektionen (Rückfall oder Relapse) können

I. Einleitung

durch denselben Keim erfolgen oder durch einen neuen Erreger, was als Reinfektion bezeichnet wird. Bei unkomplizierten HWI handelt es sich in 80 % der Fälle um eine Reinfektion (Alken und Walz, 1998).

Die Risikofaktoren für rezidivierende und/oder komplizierte, sich potentiell chronifizierende Harnwegsinfektionen sind vielfältig. Harnabflußstörungen stehen an erster Stelle. Seien es nun anatomische Anomalien wie der o.g. kindliche vesikoureteraler Reflux (VUR), Obstruktionen der Harnwege wie bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) des älteren Mannes, Harn- bzw. Nierensteinleiden (Urolithiasis), Blasenfunktionsstörungen infolge Muskelschwäche oder nach Nervenverletzungen oder eine Schwangerschaft (s. a. Abb. I.1). In zweiter Linie sind Medikamente (v.a. bestimmte Analgetika), Stoffwechselkrankheiten wie z.B. Diabetes mellitus, ein geschwächtes Immunsystem und iatrogene (ärztlich entstandene) Manipulationen wie Katheterisierung, diagnostische und operative Eingriffe ein Risiko für HWI (Herold et al., 2001; Alken und Walz, 1998).

Die Tabelle I.1 zeigt das Spektrum bakterieller Erreger und ihre prozentuale Häufigkeit unterteilt nach akuten unkomplizierten und komplizierten HWI (Herold et al., 2001).

Tabelle I.1: Bakteriellles Erregerspektrum von HWI

Akute unkomplizierte HWI	Häufigkeiten [%]	Komplizierte HWI	Häufigkeiten [%]
<i>E. coli</i>	70 - 85	<i>E. coli</i>	- 50
<i>Proteus mirabilis</i> ^a	10 - 15	<i>Proteus mirabilis</i> ^a	10
<i>Staphylokokken</i> ^b	5	<i>Klebsiellen</i> u.a. Enterobakterien	15
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
		<i>Enterokokken</i>	10
		<i>Staphylokokken</i>	10

^a sehr häufige Ursache für sog. Infektsteine (durch Ureasebildung des Keimes begünstigt)

^b Kayser et al. (1998) geben eine Häufigkeit von 10 - 20 % an

Auch Pilze (v.a. *Candida*-Subspezies) werden zunehmend häufiger gefunden, jedoch fast ausschließlich bei hospitalisierten Patienten mit Urindauerkatheter. Das Erregerspektrum bei im Krankenhaus erworbenen Infektionen unterscheidet sich etwas von dem der ambulant erworbenen Infektionen. Nach *E. coli* (40 - 50 %) sind die häufigsten Erreger nosokomialer HWI die Enterokokken (15 %). *Klebsiellen* und *Proteus*-Arten spielen ebenfalls eine Rolle. *Staphylococcus epidermidis* ist bei katheterisierten Menschen häufig. Er besiedelt Fremdkörper, auf denen er sich durch einen Biofilm schützt. Das Risiko einer HWI nimmt generell mit der Dauer der Hospitalisation zu (Sobel, 1991; Measley und Levison, 1991; Kayser et al., 1998; Herold et al., 2001).

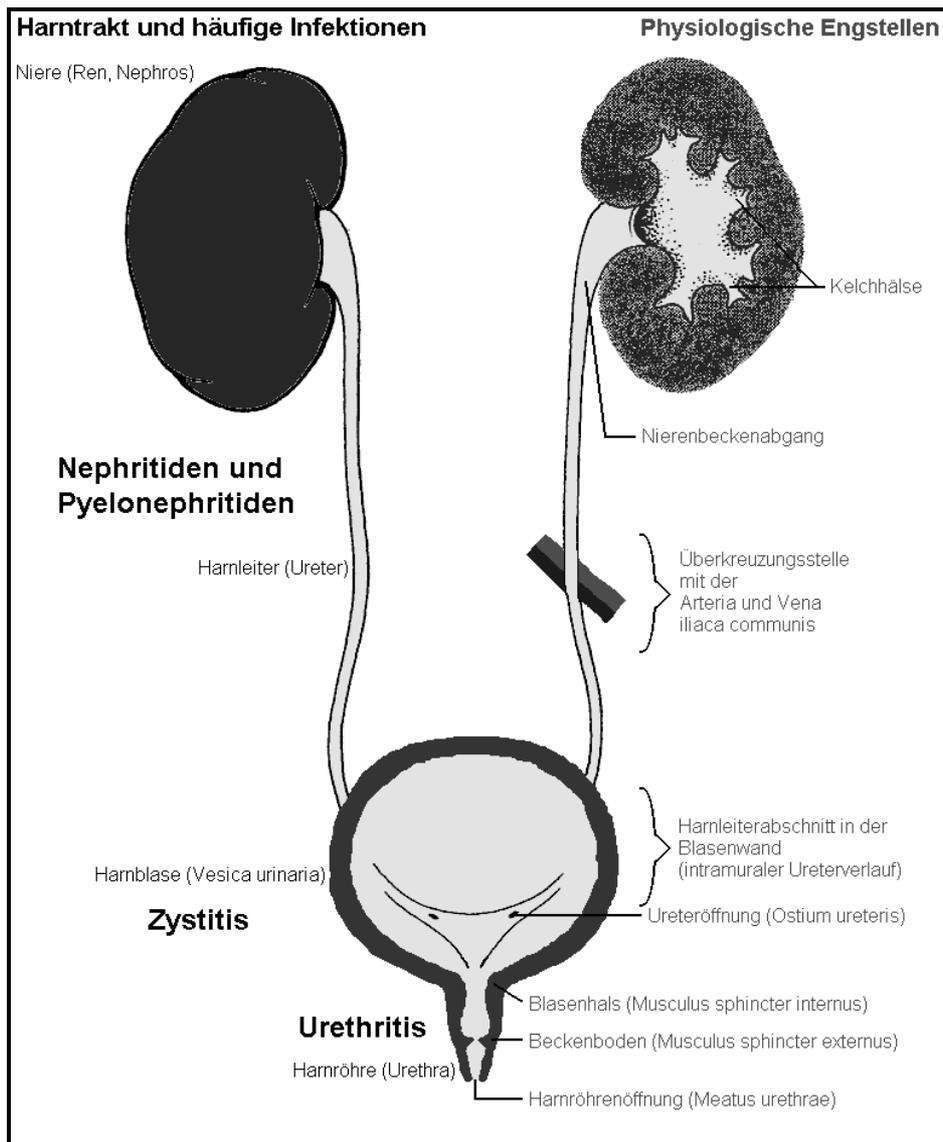


Abbildung I.1: Der Harntrakt, seine Engstellen und seine häufigen Infektionen.

Die Abbildung zeigt den Harntrakt mit seinen Anteilen sowie natürliche, präformierte Engen in seinem Verlauf. Physiologische Engstellen sind häufig Lokalisationsort von abgegangenen Nierensteinen bzw. Uretersteinen. Abflußbehinderungen sind sehr häufig Grund für eine Harnwegsinfektion. Umgekehrt können zu weite Harnwege wie z.B. beim kindlichen vesikoureteralen Reflux (VUR) oder in der Schwangerschaft ebenfalls zur HWI führen. Infektionen des unteren Harntraktes (Blase mit Harnröhre → Zystitis mit Urethritis) sind häufig unkompliziert, Infektionen des oberen Harntraktes (Nieren/-becken und Harnleiter → Nephritiden/Pyelonephritiden) prädisponieren dagegen zu komplizierten Infektionen. Über 90 % aller HWI entstehen durch Aszension von Keimen in den Harnwegen.

4. Klinische Einteilung und Formen

Klinisch kann man u.a. in unkompliziert und kompliziert unterscheiden. Bei komplizierten HWI liegen immer prädisponierende Risikofaktoren vor.

4.1. Asymptomatische Bakteriurie (ABU)

Hierbei können Bakterien im Urin nachgewiesen werden, ohne daß Symptome einer Krankheit vorliegen. Die ABU ist meistens ein Nebenbefund und nur bei Risikogruppen wie bei Schwangeren, bei Säuglingen bzw. Kleinkindern oder bei Vorliegen anderer Risikofaktoren behandlungsbedürftig (Johnson, 1991b, Warren, 1996).

4.2. Symptomatische Harnwegsinfektionen

Zystitis

Die Infektion der Harnblase ist bei einmaligem Auftreten i.d.R. (in 50 % der Fälle) eine unkomplizierte bakterielle Infektion. Sie tritt aber auch beim Vorliegen von Risikofaktoren oder bei einer Reinfektion mit aggressiven Keimen aus dem Reservoir Darm als komplizierte Infektion auf. Die Symptome sind oft erschwertes (Dysurie) und häufiges (Pollakisurie) Wasserlassen zusammen mit suprapubischen Schmerzen (in ca. 10 %) bei nicht schmerzhaftem Nierenlager. Von subklinischer Pyelonephritis spricht man, wenn eine asymptomatische Infektion des oberen Harntraktes als Infektion des unteren Harntraktes symptomatisch wird (Johnson, 1991b; Herold et al., 2001).

Urethritis

Diese Infektion der Harnröhre (distal des inneren Harnröhrenschließmuskels) wird von einigen Autoren nicht mehr zu den Harnwegsinfektionen gezählt. Diese häufige Infektion mit großer Dunkelziffer wird v.a. durch *Chlamydien*, *Ureaplasmen*, *Mycoplasmen*, *Trichomonaden*, manchmal auch durch *Herpesviren* und vereinzelt durch *Candida* verursacht. Weitere bakterielle Erreger (*E. coli*) sind bezüglich des Erregerspektrums nachrangig. Symptome können Harnröhrenausfluß, Jucken, Brennen oder Schmerzen beim Urinieren sein (Herold et al., 2001).

Akute Pyelonephritis (AP)

Diese Art der Infektion ist oft eine Monoinfektion mit *E. coli* und führt zu einer akuten interstitiellen Nephritis mit Fieber (evtl. mit Schüttelfrost), zu Dysurie und anderen Zeichen wie sie bei einer Zystitis vorkommen. Die Patienten präsentieren v.a. ein (klopf-)schmerzhaftes Nierenlager, mindestens jedoch Rücken- oder Flankenschmerzen sowie allgemeine Krankheitszeichen (Herold et al., 2001).

Chronische Pyelonephritis (CPN)

Eine CPN (Synonym: chronische interstitielle Nephritis) entwickelt sich immer auf dem Boden prädisponierender Faktoren und eine Infektion erfolgt daher auch oft sekundär. Chronische Pyelonephritiden sind meistens Reinfektionen (Johnson, 1991b).

Häufig trifft es Kinder im Säuglings- bzw. Kleinkindesalter mit angeborenen Anomalien. Die Patienten haben oft einen längeren Leidensweg hinter sich bevor durch ihre Krankengeschichte (Anamnese) die Chronizität der Entzündung diagnostiziert wird. Die Symptome sind i.d.R. unspezifisch: Kopfschmerzen, Brechreiz, Abgeschlagenheit, Gewichtsabnahme oder dumpfe Rückenschmerzen können Hinweise sein (Herold et al., 2001). Fortgeschrittene CPN zeigen im Ultraschall- oder CT-Bild Vernarbungen im Gegensatz zu Glomerulonephritiden (GN) (Johnson, 1991b).

Komplikationen der Pyelonephritis

Die vom Kliniker gefürchteten Komplikationen sind neben anfänglichen Partialfunktionsstörungen und einer späteren terminalen Niereninsuffizienz (selten), v.a. das Entstehen einer eitrigen Nephritis mit möglicher Progredienz zu einer Urosepsis (Lebensgefahr!). Sepsen entstehen nach operativen Eingriffen und nach Katheterisierungen im Bereich des Harntraktes häufiger (Johnson, 1991b). Auch paranephritische Abszesse gelten als gefährliche Komplikationen. Eine schwerwiegende Folge ist die Entstehung einer sog. pyelonephritischen Schrumpfniere (Schrumpfung durch Vernarbung), die bis zum völligen Funktionsverlust der Niere (Insuffizienz) führen kann. Pyelonephritiden bzw. interstitielle Nephritiden gehören neben den chronischen Glomerulonephritiden und neben Diabetes mellitus zu den häufigsten Ursachen einer chronischen Niereninsuffizienz (cNI), die bei allen dialysepflichtigen Patienten zugrunde liegt (Alken und Walz, 1998). In 30 - 50 % d.F. von chronischer Pyelonephritis stellt sich eine sekundäre, behandlungsbedürftige Hypertonie (Bluthochdruck) ein (Classen et al., 1998).

5. Diagnose

Nach Hinweisen aus der Anamnese und der körperlichen Untersuchung nimmt man sog. Mittelstrahlurin ab. Man bedient sich heute i.d.R. Eintauchnährböden (z.B. Uricult®), die für die Anzucht von bei HWI besonders häufig vorkommenden Bakterien und Pilzen ausgelegt sind. Für *E. coli* gelten Keimzahlen ab 10^5 CFU (colony forming units) pro ml als Beweis für eine echte Bakteriurie (Kass-Zahl), was trotzdem nur ein Richtwert sein soll (Herold et al., 2001). Manche Patienten zeigen nämlich schon bei niedrigeren Keimzahlen Symptome und außerdem sind für bestimmte Patientengruppen andere Keimzahlen aussagekräftiger, z.B. für antibiotisch vorbehandelte Patienten oder für katheterisierte Patienten (Johnson, 1991b). Folgende Tabelle stellt die Grenzwerte der Keimzahlen zusammengefaßt dar (nach Johnson, 1991b).

I. Einleitung

Tabelle I.2: Kriterien für den Beweis signifikanter Bakteriurie

Patientengruppe	CFU / ml Urin
Frauen mit Symptomen	$\geq 10^2$ für coliforme Bakterien $\geq 10^5$ für nicht coliforme Bakterien
Männer mit Symptomen	$\geq 10^3$
Patienten (Pat.) ohne Symptome	$\geq 10^5$ in mind. zwei einander folgenden Urinproben
Pat. bei suprapubischer Blasenpunktion	> 0 Urin ist normalerweise steril
Pat. mit Kathetern	$\geq 10^2$

Eine erhöhte Zahl von Leukozyten im Urin(sediment) gilt als Hinweis auf eine Pyelonephritis (Classen et al., 1998). Des weiteren kann das Urinsediment durch Lichtmikroskopie direkt auf Keime untersucht werden. Außerdem werden unspezifische Blutlaborparameter zur Diagnose herangezogen, die sog. Entzündungsparameter: Leukozytenzahl, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Preinen (CRP).

6. Therapie

Unkomplizierte Harnwegsinfektionen sprechen gut auf die Gabe von Breitbandantibiotika an. Manche Autoren favorisieren für eine akute Zystitis eine hochdosierte Einmalgabe, während andere eine mehrtägige lowdose-Therapie befürworten. Für die Antibiotikatherapie einer akuten Pyelonephritis gilt ein Mindestbehandlungszeitraum von 2 - 3 Wochen (obligat nach Antibiogramm). Die wichtigste Allgemeinmaßnahme ist immer die Aufrechterhaltung eines hohen Urinflusses durch hohe Flüssigkeitszufuhr. Die Ansäuerung des Urins ist auch protektiv (Zangwill et al., 1962). Preiselbeersaft hat therapiefördernde Wirkung, was weniger an der Ansäuerung des Urins als vielmehr an im Saft enthaltenen sekundären Pflanzenstoffen, den Tanninen, liegt, die die Anheftung der *E. coli* Bakterien behindern (Zafri et al., 1989 und Howell, 2002).

Beim ersten Rezidiv einer HWI, beim Mißerfolg der medikamentösen Therapie bei einer unkomplizierten HWI sowie beim Vorliegen einer komplizierten HWI muß immer nach Antibiogramm therapiert werden. Die Fahndung nach prädisponierenden Faktoren sollte unverzüglich eingeleitet werden. Nach einer Therapie sollte immer bakteriologisch und mikroskopisch nachkontrolliert werden (Classen et al., 1998).

7. Prognose

Die Prognosen aller unkomplizierten HWI, selbst wenn sie rezidivieren, sind günstig. Die Prognose einer chronischen Pyelonephritis ist dagegen sehr ungünstig. Die meisten Patienten können nicht mehr geheilt werden und leiden v.a. in höherem Lebensalter an z.T. schweren Folgen der Erkrankung (Herold et al., 2001).

I.B *Escherichia coli*

1. Einteilung

E. coli wird aufgrund von fortlaufend nummerierten O-, K- und H-Antigenen in Serovare (Serovarietäten = Typen) eingeteilt. Dabei sind O-Antigene die nach außen gerichteten Polysaccharidketten des Lipopolysaccharidkomplexes (LPS) der äußeren Zellmembran. Lipid A ist ein membranständiger Bestandteil dieses Komplexes und kann bei Freisetzung als stark immunogenes Toxin (Schockgefahr!) wirken. K-Antigene sind die Kapsel-Antigene des Bakteriums und H-Antigene entsprechen dem Flagellen-Antigen (Kayser et al., 1998; Mühldorfer und Hacker, 1994).

E. coli ist der häufigste Erreger bakterieller Infektionen beim Menschen. Man kann nach extraintestinalen und intestinalen Infektionen unterscheiden. Harnwegsinfektionen sind die häufigste Manifestation einer Krankheit durch *E. coli* außerhalb des Darmes. Sie werden von sog. **uropathogenen *E. coli* (UPEC)** verursacht.

Weitere medizinisch relevante Krankheiten, bei denen extraintestinale *E. coli* eine bedeutende Rolle spielen, sind Cholezystitis (Gallenblasenentzündung), Appendizitis (Wurmfortsatzentzündung), Peritonitis (Bauchfellentzündung), postoperative Wundinfektionen (Herold et al., 2001), Meningitis und Sepsis. Meningitis auslösende *E. coli* werden auch als MENEK und Sepsis auslösende *E. coli* als SEPEC bezeichnet.

Folgende Pathovare von *E. coli* spielen bei intestinalen Infektionen eine wichtige Rolle: **Enteropathogene *E. coli* (EPEC)** verursachen durch Anheftung an Darmepithelzellen und Zerstörung der Mikrovilli die in Entwicklungsländern noch sehr verbreitete Säuglingsdiarrhoe, die dort zum Großteil für die Säuglingssterblichkeit verantwortlich ist. **Enterotoxische *E. coli* (ETEC)** verursachen massive, choleraähnliche Durchfälle und werden bei über 50 % der Reisediarrhoen gefunden. Sie bilden zwei für den Durchfall ursächliche Toxine, nämlich LT (hitzelabiles Enterotoxin) und ST (hitze stabiles Enterotoxin). **Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)** infizieren den Dickdarm durch Penetration der Schleimhaut. Es kommt zu einem ruhrähnlichen Krankheitsbild. **Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)** verursachen eine blutige Kolonentzündung. Ihr wichtigster Virulenzfaktor ist das Shigatoxin. EHEC können u.a. das sog. **hämolytisch-urämische Syndrom (HUS)** hervorrufen (Kayser et al., 1998).

2. Uropathogene *E. coli* (UPEC)

Die Erreger, die unter der Bezeichnung UPEC zusammengefaßt werden, bringen eine Reihe von spezifischen Pathogenitätsfaktoren (PF) bzw. Virulenzfaktoren (VF) mit sich, die in apathogenen *E. coli* Stämmen nicht gefunden werden. Diese Pathogenitäts-

faktoren erlauben es dem Erreger, extraintestinale Epithelien zu kolonisieren und in der neuen Umgebung zu persistieren.

UPEC können in verschiedene, epidemiologisch definierte Gruppen eingeteilt werden, bei denen bestimmte O:K:H-Antigene und/oder Pathogenitätsfaktoren gehäuft nachgewiesen werden (Agace et al., 1996). Es wurde gezeigt, daß bei Patientinnen mit unkomplizierten Pyelonephritiden UPEC-Isolate zu 80 % den gleichen Pool von O-Antigenen aufweisen (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O50 und O75) und daß bestimmte K-Antigene sehr häufig sind (K1, K2, K5, K12 und K13) (Donnenberg und Welch, 1996; Sobel, 1991). Beispielsweise leiden Patientinnen, bei denen *E. coli* mit den O-Antigenen O2, O4, O6 oder O75 in der Vaginalflora zu finden sind, häufiger an Harnwegsinfektionen (Mühdorfer et al., 1999).

2.1. Pathogenitätsfaktoren von UPEC

Adhäsine

Als Adhäsine bezeichnet man Haftmoleküle, die mit sog. Pili bzw. Fimbrien assoziiert sein können, und die an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle binden. Fimbrien werden nach ihrer Bindungsspezifität eingeteilt (Karlsson, 1989; Hacker 1992). Sie sind 5 bis 10 nm dick, starr oder biegsam und können eine Länge von bis zu 2 µm erreichen (Donnenberg und Welch, 1996).

Die Fimbrien-vermittelte Adhärenz spielt für die Virulenz von *E. coli* Bakterien im Urogenitaltrakt eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit sind v.a. P-Fimbrien (*pap*-Gencluster), S-Fimbrien (*sfa*-Gencluster) und Typ-1-Fimbrien (*fim*-Gencluster) von Bedeutung. Die Organisation der für diese Fimbrien codierenden Gencluster ist sehr ähnlich. Die Operons enthalten zwischen 9 und 11 Genen (Abb. II.2). Jeweils oberhalb des Strukturgens liegen zwei regulatorische Gene, die die Expression der Fimbrien steuern. Im Falle der P-Fimbrien regulieren PapI und PapB zusammen mit globalen Regulatorproteinen (Catabolite gene activator proteine (CAP), leucine responsive regulatory proteine (Lrp), DNA adenine methylase (Dam)) die Expression der Pili über den Methylierungsgrad in der Promotorregion (Blomfield, 2001). Der Grad der Methylierung korreliert mit der Expression bzw. der Repression der Fimbrien. Im Gegensatz dazu wird die Fimbrienexpression bei den Typ-1-Fimbrien über die Orientierung eines 314-bp großen, invertierbaren DNA-Elementes gesteuert, das den Promotor für das *fimA*-Gen enthält. Typ-1-Fimbrien werden nur exprimiert, wenn dieses sog. Switch-Element in „ON“-Position steht. An diesem Prozeß sind der „integration host factor“ (IHF), Lrp und das „histon-like protein“ (H-NS) beteiligt (Xia et al., 2000).

Die Fähigkeit, die Fimbrienexpression an- und abzuschalten, nennt man Phasenvariation. Sie scheint in vielerlei Hinsicht von Umweltbedingungen abhängig zu sein (Jones et al., 1996). An die zwei Regulatorgene schließt sich die sog. Hauptuntereinheit (major subunit) an, die für das Strukturprotein (*papA*, *sfaA* und *fimA*) codiert, woraus der Schaft des Pilus hauptsächlich aufgebaut ist. Darauf folgen Gene, die für den zytoplasmatischen und transmembranären Transport sowie für die Zusammensetzung bzw. Verankerung der Strukturgene (Biogenese) verantwortlich sind. Am Ende des Operons befinden sich die Gene für die Nebenuntereinheiten (minor subunits), die u.a. für das eigentliche Adhäsion (*papG*, *sfaS* und *fimH*) codieren (Jones et al., 1996).

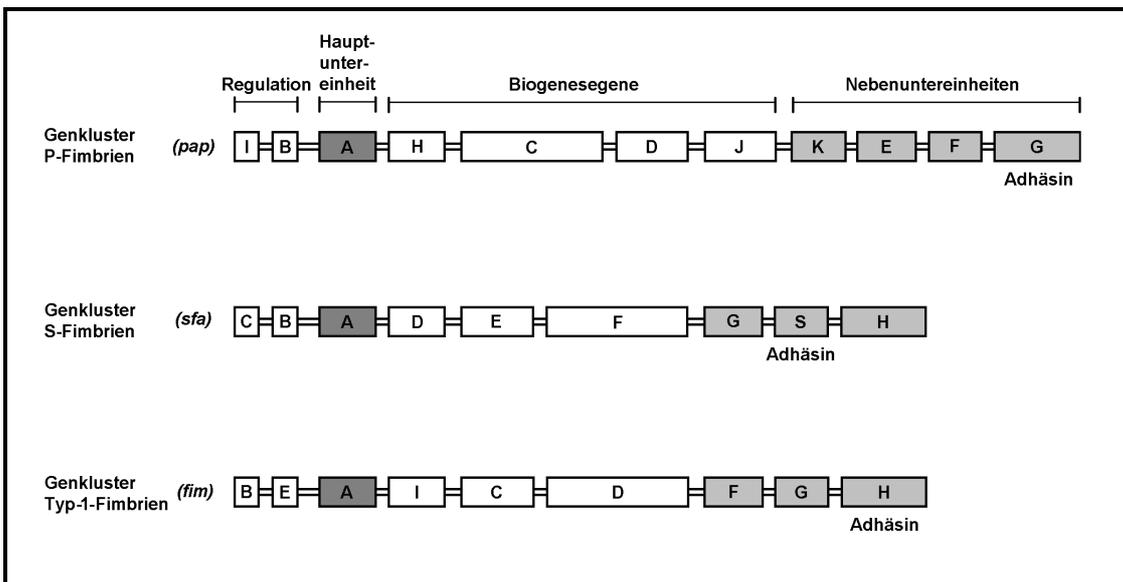


Abbildung I.2: Schemata der Gencluster der drei wichtigsten Fimbrienarten.

Die Hauptuntereinheit (major subunit), jeweils das Gen A, das den Fimbrienschaft bildet, ist dunkelgrau unterlegt. Die Nebenuntereinheiten (minor subunits) sind hellgrau markiert und das Gen, das das eigentliche Adhäsion bildet, ist beschriftet. Es gibt vier funktionelle Bereiche innerhalb eines Fimbriengencusters: einen Bereich für die Regulation der Fimbrienexpression, einen, der die Hauptuntereinheit enthält, einen Abschnitt für die an der Biogenese beteiligten Gene und den Bereich der Nebenuntereinheiten mit u.a. dem Gen für die Haftstruktur.

➤ P-Fimbrien (*pap*-Operon)

Sie spielen bei HWI eine sehr große Rolle. *Pap*-positive UPEC-Isolate werden mit absteigender Häufigkeit bei Pyelonephritiden, Zystitiden und bei asymptomatischer Bakteriurie gefunden (Plos et al., 1990; Johanson et al., 1992; 1993). Der Name P-Fimbrien kommt ursprünglich daher, daß das P-Blutgruppenantigen als Bindungsstelle für das Adhäsion gefunden wurde. P-Fimbrien können auch per Hämagglutinationstests phänotypisch nachgewiesen werden (Evans et al., 1980).

Neben dem *pap*-Operon gibt es noch zwei andere P-Fimbrien-Operons, die mit dem ersten jedoch sehr eng verwandt sind: Das *prf*-Operon (P-related fimbrial) und das *prs*-Operon (pap-related sequence) codieren ebenfalls für P-Fimbrien. Beide Operons

unterscheiden sich nur leicht in der Bindungsspezifität ihrer Adhäsine zu der des *pap*-Operons. Innerhalb der drei Klassen besteht Homologie zu 70 % (Van Die et al., 1987). Das *prf*-Operon befindet sich oft nahe den Genen für Hämolysebildung auf sog. Pathogenitätsinseln (s.u.) (Blum et al., 1994).

Die Adhäsine binden an α -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal-Rezeptoren von Wirtszellen, die v.a. auf Erythrozyten und auf Epithelien von Harnblase und Nieren vorkommen (Jones et al., 1996). Die P-Fimbrien binden außerdem über zwei *pap*-Untereinheiten (PapE und PapF) an Fibronektin, ein Protein der Extrazellulärmatrix (Westerlund und Korhonen, 1993; Jones et al., 1996).

➤ S-Fimbrien (*sfa*-Operon)

Die Gene der S- und F1C-Fimbrien sind zu 80 % homolog (Ott et al., 1988). Sie sind genetisch, funktionell und immunologisch verwandt (Hacker und Morschhäuser, 1994). Das Adhäsine bindet an sialinsäurehaltige α -Sialyl-2,3- β -Galactose-Rezeptoren, wie sie in der Niere häufig sind. Es haftet auch an Bindegewebe und außerdem an das Iamm-Horsfall-Protein (THP), ein Glycoprotein, das im Urinsediment die Hauptmasse an Proteinen ausmacht (Jones et al., 1996). Da das THP auch als Rezeptor für S-Fimbrien dient, werden S-Fimbrien-tragende *E. coli* Stämme bei einer hohen Konzentration von THP im Urin effizient eliminiert (Agace et al., 1996). S-Fimbrien exprimierende Stämme finden sich jedoch häufig bei Fällen von Neugeborenenmeningitis (Hacker et al., 1993). Weiterhin kann das Adhäsine auch an Laminin, ein Protein der Extrazellulärmatrix (Virkola et al., 1993), und an den Gewebe-Plasminogenaktivator tPA (tissue plasminogen activator) binden (Parkkinen et al., 1991). S-Fimbrien können mittels Hämagglutinationstest nachgewiesen werden, für F1C-Fimbrien ist bisher kein phänotypischer Nachweis bekannt. Es gibt eine den S-/F1C-Fimbrien verwandte Fimbrienart, die Sfr-Fimbrien (S-/F1C-fimbriae related). Sie zeigen serologische Kreuzreaktivität, exprimieren aber keine S-spezifischen Bindungseigenschaften (Mühldorfer et al., 1999).

➤ Typ-1-Fimbrien (*fim*-Operon)

Diese Fimbrienart wird am häufigsten exprimiert, und zwar sowohl von pathogenen wie auch von apathogenen *E. coli*. Das Adhäsine ist interkalierend in den Fimbrienschafte und die Spitze eingebaut. Es bindet an Tri-Mannose-haltige Strukturen (M_3 ; α 1-3, α 1-6-D-mannotriose), aber auch an Mono-Mannose-haltige Strukturen (M_1) (Sokurenko et al., 1998). Solche Rezeptoren finden sich auf einigen Epithelien, v.a. im Magen-Darm-Trakt, in der Niere (nur im Glomerulum, Sammelrohr und distalen Tubulus), im unteren Harntrakt, auf neutrophilen Leukozyten und auf Makrophagen (Jones et al., 1996).

Außerdem binden sie an Laminin, ein Protein der Extrazellulärmatrix, an das in Körperflüssigkeiten vorkommende Immunglobulin IgA und an das bereits o.g. Iamm-Horsfall-Protein (Jones et al., 1996; Johnson, 1991a; Friman et al., 1996). Typ-1-Fimbrien werden v.a. bei Zystitiden gefunden, während sie bei Pyelonephritiden eine untergeordnete Rolle spielen (Svanborg et al., 1994).

Toxine

Es handelt sich v.a. um die beiden Toxine α -Hämolysin und Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1 (CNF1), die bei UPEC-Isolaten vergleichsweise häufiger sind als in Keimen der normalen Darmflora.

α -Hämolysin wird durch das Gencluster *hly* codiert, das zu 95 % chromosomal gefunden wird und nur zu 5 % auf Plasmiden. Es kommt in 35 bis 60 % der *E. coli* Isolate vor, die an extraintestinalen Infektionen beteiligt sind (Ludwig und Goebel, 1997). Das α -Hämolysin gehört zur sog. RTX-Familie (repeats in toxin), die auch bei anderen gram-negativen Bakterien vertreten ist (Welch et al., 1992). Die toxische Wirkung von α -Hämolysin beruht auf der kalziumabhängigen Bildung eines sog. Transmembrankomplexes, der sich in die Zellmembran als Pore mit einem Durchmesser von 1 - 2 nm integriert, die Membran so „löchert“ und die Zelle lysiert. Das *hly*-Gencluster beinhaltet vier Gene (*hlyCABD*). Das Genprodukt von *hlyA* codiert die lytische Komponente der Transmembranpore (Donnenberg und Welch, 1996). HlyC ist für die Aktivierung von HlyA notwendig. Die Proteine HlyB und D sind für den Transport von HlyA nach außen verantwortlich. HlyB hat Ähnlichkeit mit dem ATP-bindenden Ende von Proteinkinasen und mit anderen bakteriellen Transportproteinen. Das Membranprotein TolC aus der Gruppe der sog. outer membrane proteins (Omp) ist für den HlyA-Transport notwendig (Mühldorfer et al., 1999). Das α -Hämolysin wirkt nicht allein auf Erythrozyten, wie der Name vermuten lassen mag, vielmehr sind bisher eine Reihe von Zelltypen ermittelt worden, auf die α -Hämolysin wirkt. Dazu gehören v.a. Leukozyten und Epithelzellen (Welch, 1991; Warren et al., 1995).

Der Zytotoxisch-nekrotisierende Faktor 1 (CNF1) und der verwandte Zytotoxisch-nekrotisierende Faktor 2 (CNF2) wirken auf Epithelien nekrotisch. CNF2 wird nur in Wiederkäuern gefunden und verursacht starke Dermonekrosen im Gegensatz zur moderaten Wirkung von CNF1. Die dermonekrotische Wirkung beruht auf der Umwandlung von Mikrofilamenten der Zelle in sog. Streßfasern, woraufhin mehrkernige Riesenzellen gebildet werden (Fiorentini et al., 1995; Flatau et al., 1997). CNF1 stimuliert das Phagozytosesystem (Falzano et al., 1993) auf Epithelien in Kultur, was möglicherweise ein Mechanismus ist, um in die Zelle aufgenommen zu werden. UPEC,

die *cnf1* tragen, kommen häufiger bei systemischen Infektionen vor. Man kann also vermuten, daß die Wirkung von CNF1 systemische Infektionen begünstigt (Mühldorfer et al., 1999; De Rycke et al., 1996).

Kapseln

Die Kapsel (K-Antigen der O:K:H-Klassifikation) gehört ebenfalls zu den Pathogenitätsfaktoren (PF) von UPEC-Isolaten. Wie bei den O-Antigenen können auch bei den K-Antigenen bestimmte Typen häufiger in Abhängigkeit von einer bestimmten Harnwegsinfektion nachgewiesen werden: K1, K2, K5, K6, K12, K13, K29 und K51 (Johnson, 1991a). Kapseln vermitteln die sog. Serumresistenz, die dazu führt, daß das Bakterium nicht mehr durch den Membran-Angriffs-Komplex (MAC) des Komplementsystems lysiert werden kann. Die Opsonisierung des Bakteriums durch Komplementfaktoren wird verhindert und damit auch die chemotaktische Wirkung auf das Immunsystem (Leukozyten). Außerdem wird durch molekulares (Antigen-) Mimikry ein gewisser Schutz gegen das Wirtsimmunsystem erreicht. Als molekulares Mimikry bezeichnet man das Präsentieren von nachempfundenen oder eingebauten Antigenstrukturen des Wirts, die somit von der Abwehr desselben nicht als fremd erkannt werden. Beispielsweise zeigt die K1-Kapsel von *E. coli* Neuraminsäure-Antigene wie sie in ähnlicher Weise auch während der Embryonalentwicklung des Gehirns (als N-CAM) vorkommen (Kayser et al., 1998; Jann und Jann, 1992). K1-Kapseln bestehen aus Polymeren von linear α -2,8 verknüpften Sialinsäureresten (NeuNAc), deren Anordnung zu einer stark negativ geladenen Oberfläche führt. Das *kps*-Gencluster hat drei funktionelle Regionen (1-3), wobei die mittlere Region (2) für Enzyme zur Biosynthese und Polymerisation der Kapsel codiert und die Gene der angrenzenden Regionen für den periplasmatischen Transport und die Ausschleusung der Polymerfragmente verantwortlich sind. Die Gene der Region 2 bilden das *neu*-Gencluster. Das K1-Antigen wird häufiger bei *E. coli* Stämmen gefunden, die eine Neugeborenenmeningitis verursachen und es wird auch häufiger bei UPEC isoliert, die bei Kindern Pyelonephritiden hervorrufen (Mühldorfer et al., 1999).

K5-Kapseln wurden relativ häufig bei Sepsen in Zusammenhang mit Harnwegsinfektionen gefunden (Herias et al., 1997). Ihre Struktur ähnelt der des Heparin (Jann und Jann, 1992). Im Tierversuch führten K5-Kapseln zu einer erhöhten Kolonisierungsrate, was vermuten ließ, daß die Funktion von Kapseln ursprünglich die Sicherung der Persistenz im Kolon war und ihre Virulenz evtl. nur ein Nebeneffekt ist (Herias et al., 1997; Johnson, 1991a).

Eisenaufnahmesysteme (Siderophore)

In UPEC gibt es im Wesentlichen zwei Eisenaufnahmesysteme, die zu ihrer Virulenz beitragen: der Hydroxamattyp Aerobaktin, der hauptsächlich bei extraintestinalen *E. coli* Isolaten (UPEC, SEPEC) vorkommt, und der Catecholtyp Enterochelin (Synonym: Enterobaktin), der bei allen Isolaten gleichermaßen vorkommt (Neilands, 1995; Sobel, 1991).

Eisenaufnahme ist für Mikroorganismen essentiell (Neilands, 1992). Eisen wird benötigt für den Sauerstoff- und Elektronentransport, für die DNA-Synthese und für das Wachstum (Neilands, 1995). Insbesondere in Umgebungen, in denen Eisen rar ist, sind Siderophore ein Vorteil für den Erreger. In Körperflüssigkeiten, wie z.B. Serum oder Urin, kommen freie Eisenionen nur in einer sehr geringen Konzentration vor. Bakterien jedoch benötigen für gutes Wachstum eine deutlich höhere Konzentration (Kayser et al., 1998).

Wie schon aus der o.g. Verteilung der beiden Siderophorensysteme abzuleiten ist, ist Aerobaktin in diesem Zusammenhang bedeutender. Die Genprodukte sind in der Lage, dem Wirt aus dessen Eisenchelatoren (z.B. aus Transferrin) Fe^{3+} -Ionen zu entziehen, durch Membranproteine über die eigene Zellmembran hinweg zu schleusen und in den eigenen Speicher einzubauen (Mühldorfer et al., 1999). Das Aerobaktincluster besteht aus fünf Genen, die sowohl chromosomal- als auch plasmidcodiert vorkommen können. In einem Plasmid wird das Aerobaktin-Operon oft von sog. IS1-Elementen (Insertionssequenz), die i.d.R. Transposons innerhalb der DNA flankieren, eingeschlossen. Häufig wurde Aerobaktin in sog. ColV-Plasmiden gefunden (Neilands, 1992). Vier der fünf Gene codieren für Biosynthese-Enzyme, *iucA-D* (iron uptake chelate), und ein Gen *iut* (iron uptake) trägt die Information für das Rezeptorprotein (De Lorenzo et al., 1986; Crosa, 1989; Neilands, 1995).

Pathogenitätsinseln (PAIs)

Pathogenitätsinseln (pathogenicity islands) sind große, instabile DNA-Abschnitte, die häufig mit tRNA-Genen und/oder IS-Elementen (s.o.) assoziiert sind. Diese Assoziation ist ein Hinweis darauf, daß es sich bei PAIs um im Genom inserierte DNA von anderen Bakterien, Plasmiden oder Bakteriophagen handelt, da tRNA-Gene und Insertionssequenzen häufig als Integrationsstellen für Fremd-DNA fungieren (Hacker und Kaper, 2002; Blum et al., 1994; Inouye et al., 1991; Sun et al., 1991). Der vom übrigen Genom unterschiedliche GC-Gehalt von PAIs ist ebenfalls ein Indiz dafür, daß Virulenzgene evtl. aus anderen Mikroorganismen übernommen worden sind (Hacker und Kaper, 1999; Hacker et al., 1997 und 1999). Die PAIs der *E. coli* Stämme 536 (O6:K15:H31) und J96 (O4:K6:H⁻) sind detailliert beschrieben (Dobrindt et al., 2002;

Blum et al., 1994; Swenson et al., 1996). Bemerkenswerterweise liegen in UPEC die virulenzcodierenden Gene fast nur chromosomal vor (Mühdorfer und Hacker, 1994). Die PAI-Abschnitte codieren mindestens ein Gen, das zur Virulenz beiträgt. In PAIs von UPEC wurden häufig Kopplungen verschiedener Virulenzgene gefunden, z.B. läßt sich das *hly*-Gencluster zusammen mit dem *prf*-Operon für P-Fimbrien auf PAI II₅₃₆ finden (Blum et al., 1994). PAI-ähnliche Strukturen wurden auch in anderen Mikroorganismen gefunden, z.B. in *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* und in Salmonellen (Schmidt und Hensel, 2004; Donnenberg und Welch, 1996).

In *Yersinia pestis* und *enterocolitica* wurde schon früher eine sog. high-pathogenicity island (HPI) gefunden, die u.a. Gene (ferric yersinia uptake (*fyuA*) und verschiedene iron repressible proteins (*irp*)) für die Regulation, Biosynthese und den Transport des Eisenaufnahmesystems Yersiniabaktin (*Ybt*) enthält. Diese sog. Kernregion der HPI weist eine Größe von etwa 30 kb aus und wurde auch in *E. coli* Isolaten gefunden (Heesemann et al., 1993; Carniel et al., 1996; Schubert et al., 1998 und 1999).

2.2. Wirtsfaktoren für UPEC

Es gibt epidemiologisch definierte Patientengruppen, die häufiger an Harnwegsinfektionen erkranken als andere. Alle Patientengruppen haben meistens einen oder mehrere Risikofaktoren in ihrer Anamnese (Warren, 1996). Welche Einflüsse neben Risikofaktoren noch in Bezug zu einer UPEC-Infektion stehen bzw. stehen könnten, wird in diesem Kapitel beschrieben.

➤ Rezeptoren der Wirtszelle

Die Expression/Aktivierung sowie die Dichte von empfänglichen Rezeptoren auf den Wirtszellen spielen eine Rolle für die Adhäsion der Fimbrien. So wurde z.B. eine Korrelation zwischen Trägern des P₁-Blutgruppenantigens und *pap*-positiven Isolaten aus deren Fäkalflora festgestellt. Träger dieser Blutgruppe haben ein 11-fach höheres Risiko an durch *pap*-positive Stämme ausgelösten rezidivierenden, akuten Pyelonephritiden zu erkranken. Das P₁-Blutgruppenantigen bietet P-Fimbrien den benötigten Rezeptor (Plos et al., 1995; Agace et al., 1996).

Der sekretorische Status eines Menschen entscheidet ebenfalls über seine Infektionsempfänglichkeit. Die Eigenschaft Sekretor oder Nicht-Sekretor zu sein wird vererbt (Häufigkeit in Europa ca. 3:1 für Sekretoren). Es handelt sich hier um einen Glycosyltransferasen-Defekt, und zwar von den Transferasen, die für die Anheftung der ABH-Blutgruppen-Determinanten verantwortlich sind (Agace et al., 1996). Die ABH-Blutgruppenantigene werden nicht nur auf Erythrozyten, sondern auch auf

Leukozyten und Thrombozyten sowie Gewebe- und Epithelzellen präsentiert. Sie werden auch in Serum und in andere Körperflüssigkeiten sezerniert. Bei A₁-Sekretoren wurde festgestellt, daß sie im Gegensatz zu anderen Individuen einen Rezeptor für *prsG_{J96}*-positive Stämme auf ihrem Uroepithel tragen und im Versuch wurde eine deutliche Häufung der Erkrankungen durch diese Stämme festgestellt (Agace et al., 1996). Nicht-Sekretoren haben ein höheres Risiko für eine Infektion mit UPEC, die P- und Typ-1-Fimbrien exprimieren (Stapleton et al., 1995; Warren, 1996).

➤ **Urin**

Ein ausreichender Urinfluß ist, wie schon an anderer Stelle ausgeführt, von Bedeutung. Die Urinzusammensetzung bezüglich inhibitorisch wirksamer Substanzen spielt ebenfalls eine gewichtige Rolle. Wie o.g. binden Typ-1- und S-Fimbrien u.a. an Tamm-Horsfall-Protein, Hauptproteinmasse des Urins, und sie werden teilweise auf diese Weise eliminiert. Das Protein zeigt auf seiner Oberfläche die zur Anheftung der Pili benötigten Mannose- und Sialinsäurereste.

Urin-pH-Wert und sezernierte Ionen bzw. Salze können ebenfalls Einfluß auf das Wachstum von Bakterien nehmen, nicht zuletzt über eine Urinsteinbildung. Eine Infektion mit Urease-produzierenden Erregern, z.B. *Proteus mirabilis* oder *Ureaplasma urealyticum*, begünstigt per se eine (Infekt-) Steinbildung (Measley und Levison, 1991). Der optimale pH für das Keimwachstum im Urin liegt zwischen 6 und 7, außerhalb dieses Intervalls wachsen Kulturen schlechter. Zangwill und Kass hatten schon 1962 Erfolg in der Bekämpfung von HWI als sie den Urin-pH durch Gabe von L-Methionin (Acimethin®) absenkten (Zangwill et al., 1962). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß sehr hohe oder sehr niedrige Osmolalität das Keimwachstum verschlechtert. *E. coli* Bakterien verfügen möglicherweise über protektive Mechanismen, die es erlauben, in hypertonem Urin zu überleben (Agace et al., 1996).

➤ **Immunabwehr**

Die lokale und systemische Immunabwehr hat ebenfalls Einfluß auf das Krankheitsgeschehen und sie ist abhängig von der Lokalisation der Infektion. Während es bei akuten Pyelonephritiden zu einer generalisierten Immunantwort kommt, scheinen Infekte des unteren Harntraktes eine eher lokale Antwort zu stimulieren. So ist nachgewiesen, daß Uroepithelien lokal wirksame (IL-8) und systemisch wirksame (IL-6) Zytokine sezernieren können, daß sie mit anderen mukosalen und systemischen Zellen der Abwehr kommunizieren und daß sie die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Gewebe des Urogenitaltraktes (mit-)steuern (Agace et al., 1996).

➤ Muköse Schichten

Die Zusammensetzung des Schleimes, der Darm- und Harntraktepithelien bedeckt, ist ebenfalls für Infektionsanfälligkeit mitbestimmend. Muköse Schichten haben immer auch eine Abwehrfunktion, die sie v.a. mit Hilfe von sezerniertem Immunglobulin IgA und bestimmten Abbauenzymen erfüllen. Typ-1-Fimbrien können an IgA binden und es wurde festgestellt, daß diese Fimbrien bei IgA-defizienten Individuen in geringerer Zahl in der intestinalen Flora vorkommen, woraus gefolgert wurde, daß Typ-1-Fimbrienbindung an IgA für die Darmkolonisation wichtig sein könnte (Friman et al., 1996). Außerdem scheint es weitere Komponenten der Schleimschicht zu geben, die bakterizide Eigenschaften aufweisen (Agace et al., 1991).

➤ Schwangerschaft

Die hormonelle Umstellung während der Schwangerschaft ist bei dieser Patientengruppe ein wichtiger Faktor. Sie führt zu einer veränderten Standortflora und beeinflußt die Rezeptorexpression und den pH-Wert im Urogenitalbereich (Mühldorfer et al., 1999). Außerdem verlangsamt sich die Ureterperistaltik (Alken und Walz, 1998). Der Urintransport erfolgt in der fortgeschrittenen Schwangerschaft nicht mehr in sog. Spindeln (Portionen einer peristaltischen Welle), sondern durch den erhöhten Nierenbeckendruck druckpassiv, so daß der Harnleiter durchgehend offen ist. In der zweiten Schwangerschaftshälfte kommt es aufgrund der Ureterkompression durch die Fruchtblase in ca. 45 % aller Fälle zu einem Harnaufstau (bevorzugt rechtsseitig). Zwischen 8 und 12 % der Schwangeren bekommen Symptome einer HWI (meist Flanken- oder Rückenschmerzen). Bei solchen Patientinnen kommt es vermehrt zu vorzeitigen Wehen und in der Folge auch zu einer erhöhten Frühgeburtenrate. Die Urinproduktion Schwangerer liefert durch vermehrte Herztätigkeit eine bis zu 30 % gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR), was bedeutet, daß inhibierende Substanzen verdünnt im Urin vorliegen. Auf der anderen Seite sind neben den harnpflichtigen Substanzen auch die Konzentrationen von Glucose, Proteinen und Aminosäuren im Urin erhöht, die teilweise von Bakterien verstoffwechselt werden und so infektbegünstigend wirken (Alken und Walz, 1998). Die Immunreaktion schwangerer Frauen, die eine akute Pyelonephritis entwickelt haben, ist schwächer als bei nicht schwangeren Frauen: Das Uroepithel produziert weniger Zytokine (IL-6) (Agace et al., 1996).

➤ Diabetes mellitus

Bei zuckerkranken Patienten wurde gegenüber gesunden Menschen eine 2- bis 4-fach höhere Rate an Bakteriurien gefunden, die jedoch klinisch meist asymptomatisch

waren. Glucosurie begünstigt Pilzinfektionen des Harntraktes. Im Tierversuch erhöht Glucosurie das Risiko aufsteigender HWI, genauso wie Hyperglycämie hämatogene *E. coli* Infektionen begünstigt (Measley und Levison, 1991).

➤ Vernarbungen der Niere

Es gibt Hinweise darauf, daß Narben des Nierenparenchyms und der Virulenzgrad infizierender UPEC-Stämme in Beziehung zueinander stehen (Lomberg et al., 1989; Agace et al., 1996). Ein Reflux (VUR) stellt wegen der möglichen Folge einer chronischen Infektion das größte Risiko für Narbenbildungen in der Niere dar (Warren, 1996; Herold et al., 2001).

➤ Der ältere Mensch

Im Senium sind Harnwegsinfektionen bei Frauen und Männern ähnlich verteilt (Herold et al., 2001). Beide Geschlechter neigen durch Muskelinsuffizienz zur Restharnbildung in der Blase und außerdem konnten Sobel und Kaye (1985) zeigen, daß Uromodulin (Synonym: Tamm-Horsfall-Protein, THP) im Urin älterer Menschen erniedrigt ist, was als Folge eine verminderte Ausschwemmung von Typ-1- und S-Fimbrien tragenden UPEC vermuten läßt. Bei Männern kommt es im Alter oft zu obstruierenden (benignen) Prostatahyperplasien (BPH) sowie zu einem erniedrigten Fluß von Prostatasekret, das an sich bakterizide Eigenschaften hat (Measley und Levison, 1991). Bei älteren Frauen (v.a. nach Schwangerschaften) senkt sich oft die Beckenbodenmuskulatur und viele leiden an der postmenopausalen Hormonumstellung des Körpers. Durch die Umstellung kommt es zu einer Atrophie der Vaginalschleimhaut und des Harnröhrenepithels, der intravaginale pH-Wert steigt und die Besiedelung mit Milchsäurebakterien geht zu Gunsten von Enterobacteriaceae zurück. Eine Östrogensubstitution nach den Wechseljahren wirkt u.a. auch diesen Erscheinungen entgegen und vermindert deutlich die Erkrankungsrate für HWI (Agace et al., 1996).

2.3. Prävention von UPEC-Infektionen

Neben den bereits besprochenen Punkten wird auch durch die Entwicklung von Impfstoffen versucht, die Häufigkeit von Harnwegsinfektionen zu senken. Dieser Ansatz erscheint insbesondere hinsichtlich des vermehrten Auftretens von häufig plasmid-codierten Resistenzen gegen Antiinfektiva sinnvoll. Im Tierversuch durchgeführte Immunisierungsstudien ergaben, daß gegen O- und K-Antigene geimpfte Tiere einen gewissen Schutz gegen die Infektion mit den entsprechenden Stämmen zeigten. Eine Immunisierung gegen P-Fimbrien war ebenfalls erfolgreich. Auch zeigte eine mukosale Immunisierung (der Nasenschleimhaut) mit durch Formalin abgetöteten extra-

intestinalen *E. coli* Bakterien, deren K- und O-Antigene modifiziert wurden, eine signifikante Immunantwort (Russo et al., 2007). Beim Menschen konnte eine perorale Immunisierung mittels gefriergetrockneter *E. coli* Extrakten (OM-89) die Rezidivrate bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen innerhalb eines Jahres von 55 % auf 40 % in der Verumgruppe senken (Bauer et al., 2005), während eine Immunisierung mit einem rekombinanten Impfstoff gegen Typ-1-Fimbrien (Langermann und Ballou, 2001) klinisch enttäuschte (Russo et al., 2007). Versuche mit Rezeptoranaloga erbrachten im Tierversuch ebenfalls einen gewissen Schutz (Agace et al., 1996).

Trotz des Vorkommens weniger K- und O-Antigene unter den uropathogenen *E. coli*, ist die Antigenvariabilität der Erregergruppe sehr groß, so daß ein durchschlagender Impferfolg in erster Linie mit attenuierten Ganzzellimpfstoffen zu erwarten ist (Russo et al., 2007). Letztendlich muß die Effizienz neuerer Impfstoffe erst noch durch eine Langzeitanalyse evaluiert werden.

I.C Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden über einen gewissen Beobachtungszeitraum Stuhl- und Urinproben von Patientinnen gesammelt, die alle an chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden. Die aus diesen Proben isolierten *E. coli* Stuhl- und Urinisolate wurden einer Virulenzanalyse unterzogen. Die Pathogenitätsfaktoren der Isolate wurden mittels Multiplex-PCR (mehrere Primerpaare in einem Ansatz) bestimmt und deren Häufigkeiten und Kombinationen ermittelt. Mit Hilfe dieses Virulenzprofils sowie der Rep-PCR (Amplifikation bestimmter repetitiver Sequenzen), deren Elektrophoresemuster man untereinander vergleicht, wurden die *E. coli* Isolate in Klone eingeteilt. In einem weiteren Schritt wurde diese Klonddefinition durch die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) überprüft. Hierbei wird die DNA der Isolate mit einem selten schneidenden Restriktionsenzym (*Xba*I) verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, wodurch sich eine Art genomischer Fingerabdruck ergibt. Durch dieses Identitätsscreening sollte die Persistenz bestimmter Klone im Patienten gezeigt werden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war, mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese eventuelle DNA-Umlagerungen (z.B. Deletionen) in den untersuchten Klonen zu identifizieren, welche einen Anpassungsmechanismus der Erreger an ihre sich verändernde Umwelt darstellen könnten (Blum et al., 1994).

Die Arbeit integriert Teile der Dissertationen von Brauchle (2002) und Maibaum (2003).

II. Materialien

II.A Geräte

Gerät(e)	Firma/Firmen, Gerätetyp(en)
Analysenwaage/Feinwaage	Chyo, JL-180
Autoklaven	Fedegari Autoclavi FOM/B50 und FYS3, Varioclav® Typ 500
Brutschrank	Memmert, TV 40 b
Cleanbench	Nunc, Microflow Sicherheitswerkbank
ddH ₂ O-Wasseraufbereitung	Millipore, Milli Q ^{UF} Plus®
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammer	Consort Pharmacia Biotech Institutswerkstatt
Elektrophoresenetzgerät	Consort, E 451 und E 455 Pharmacia Biotech, EPS 200
Flaschen, Gläser, Kolben	Schott
Gefrierschrank	Privileg
Gel-Dokumentation	BIORAD, Gel Doc 2000 (inkl. PC + Software)
Kühlraum/-kammer	Karl Weiss
Kühlschrank	Privileg
Magnetrührer	CENCO GLW, M 23 Heidolph, MR 3001 und MR 3001 K Janke und Kunkel, KMO 2
Meßzylinder/-becher	Brand
Mikrowelle	Privileg und Moulinex
PCR-Thermocycler	Biometra, T3 Thermocycler Eppendorf, Mastercycler personal Biomed, Thermocycler 60
PF-Elektrophoresekammer	BIORAD, Electrophoresis Cell III
PF-Elektrophoresenetzgerät	BIORAD, CHEF-DR™ III
PF-Laufpuffer-Kühlaggreat	BIORAD, Mini Chiller 1000
PF-Laufpuffer-Pumpe	BIORAD, Variable Speed Pump
pH-Meter	WTW, pH 523 und pH 525, Digital pH-Meter
Photometergerät	Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000
Photometerküvetten	Brand, Plastibrand®
Photoprinter	Mitsubishi, P 90
Pipetten	Gilson, Pipetman P 20, P 200, P 1000 Eppendorf, Research 0,5-10 µl
Pipettiergerät	Brand, accu-jet® Hirschmann, Pipettus®
Schüttelinkubator	INFORS HT, ITL New Brunswick Scientific, innova™ 4300
- 80°C-Gefrierschrank	Heraeus
Tischinkubator	Eppendorf, Thermostat 5320 Liebisch, Thermoblock
Tischzentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5415 und 5415 C
Vibrationsmixer	Janke und Kunkel, Vibrofix VF1 electronic Scientific Industries, Vortex Genie 2

II. Materialien

Waage	Chyo, MP-3000 Kern, 470-36 OHAUS, Navigator™
Wasserbad	GFL, 1083 GFL, 1008

II.B Verbrauchsmaterialien

Material(ien)	Firma/Firmen, Typ(en)
Caps	Sarstedt
Caps für PCR (50 µl)	ABgene
Kanülen	Dispomed und Microlance
Mikrofilter	Millipore, Millex® GS Ø 0,22 µm
Objekträger	Knittel
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner und Falcon
Schutzhandschuhe	Igefa, Kolibri® Ansell, TNT™ Blue (Nitril-Kautschuk)
Spritzen	Henke

II.C Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien sowie Reagenzien-Kits und Enzyme sind im folgenden aufgelistet. Manche methoden- oder materialspezifischen Stoffe sind nur im jeweiligen Kapitel erwähnt.

Chemikalie(n), Typ(en) (MG [g/mol])	Firma/Firmen
Aceton (für Laborzwecke)	Roth
Agar, granulated (für LB)	Difco Lab. (Becton-Dickinson)
Agarose ultrapure (für Elektrophorese-Gele)	GibcoBRL (Life Technologies)
Alkohol (für Laborzwecke)	Roth
Borsäure (61,83)	AppliChem
Bromphenol-Blau	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid, 99,5 %ig)	Sigma-Aldrich
DTT (Dithiothreitol) (154,2)	Roth
EDTA-Na ₂ (Ethylen-diamin-tetraacetat) (372,24)	AppliChem
Essigsäure/Eisessig (100%ig)	AppliChem
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth
Ficoll (Type 400)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
Hefeextrakt (Yeast Extract) (für LB)	GibcoBRL (Life Technologies)
konz. HCl (37%ig)	AppliChem
konz. NaOH (1N)	Merck
Lactose, D-(+)-	Roth
Low-Melting-Agarose (für LGT-Puffer)	Eurobio
MacConkey-Agar (Fertigpulver)	Difco Lab. (Becton-Dickinson)
Mannose, D-(+)-	Roth
MgCl ₂ (203,3)	Merck
N-Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich

NaCl (58,44)	Roth
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Saccharomyces cerevisiae (tr. Bäckerhefe)	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton aus Casein (für LB)	Roth
Tris-Base ultrapure (121,14)	AppliChem
Xylencyanol	Merck

Reagenzien-Kits, Typ(en)	Firma/Firmen
100 mM dNTP-Set ^a	GibcoBRL (Life Technologies)
Taq DNA Polymerase, recombinant mit 500 Units (5U/µl)	GibcoBRL (Life Technologies)
mit 10X PCR Buffer mit 50 mM MgCl ₂	
Taq DNA Polymerase, recombinant mit 250 Units (1U/µl)	Roche
mit 10X PCR Buffer with MgCl ₂	
mit 10X PCR Buffer without MgCl ₂	
mit 25 mM MgCl ₂	
XbaI 3000 Units (20.000U/ml)	New England Biolabs
mit 10X NEBuffer	
mit 100X BSA	

^a Die dNTPs müssen vor Benutzung verdünnt werden.

Tabelle II.1: Gebrauchsfertigen 10 mM dNTP-Mix herstellen

Komponenten	für 100 µl	für 200 µl	für 400 µl
100 mM dATP	10 µl	20 µl	40 µl
100 mM dCTP	10 µl	20 µl	40 µl
100 mM dGTP	10 µl	20 µl	40 µl
100 mM dTTP	10 µl	20 µl	40 µl
ddH ₂ O	60 µl	120 µl	240 µl
ausreichend für ca.	50 - 100 PCRs	100 - 200 PCRs	200 - 400 PCRs

II.D Medien und Agarplatten

Alle angesetzten Flüssigkeiten werden verschlossen und mit Autoklavierband gekennzeichnet autoklaviert (für 20 Min bei 121 °C und 3 bar Dampfdruck). Beim Autoklavieren ist es günstig, die Gefäße nicht bis zur maximalen Höhe zu füllen, um einem Überkochen vorzubeugen.

Zur Herstellung von Agarplatten werden den Lösungen (vor dem Autoklavieren) 15 g Agar pro Liter zugegeben, so daß eine 1,5%ige Agarlösung entsteht. Nach dem Autoklavieren werden die Erlenmeyerkolben oder Glasflaschen in einem 50 °C Wasserbad zwischengelagert. Sie können dort entnommen werden und in steriler Umgebung in Petrischalen gegossen werden. Man benutzt ca. 20 ml pro Petrischale. Jetzt abkühlen und fest werden lassen. Danach trocknen und im Kühlschrank aufbewahren, d.h. Deckel der Schale nach unten und Nährboden oben hängend, damit kein Kondenswasser auf den Nährboden läuft.

II. Materialien

LB (Luria-Bertani) Medium

Trypton/Pepton aus Casein 10 g
Hefeextrakt 5 g
NaCl 5 g ad
ddH₂O 1 l

Im 2000-ml-Meßzylinder die Substanzen einwiegen und mit Rührfisch auf dem Magnet-rührgerät gut mischen. Die Lösung auf kleine Glasfläschchen (5 x 250 ml) verteilen und zum Autoklavieren geben. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

LB (Luria-Bertani) Agar

Trypton/Pepton aus Casein 10 g
Hefeextrakt 5 g
NaCl 5 g
Agar 15 g ad
ddH₂O 1 l (1,5%ige Agarlösung)

Im 2000-ml-Meßzylinder die Substanzen einwiegen und mit Rührfisch auf Magnet-rührgerät gut mischen. In einen ausreichend großen Erlenmeyerkolben umfüllen und zum Autoklavieren geben.

Blut-Agar

LB-Agar 1000 ml ad
Humanblut (90 -) 100 ml

Der Erlenmeyerkolben mit frisch autoklaviertem flüssigem LB-Agar muß, nachdem er aus dem 50°C Wasserbad genommen wurde, noch etwas abkühlen (auf ca. 40°C), damit das Blut beim Hineingeben nicht gerinnt. Der Agar darf aber auch nicht zu kalt werden, weil er sonst schon fest wird. Das steril angelieferte Humanblut wird in steriler Umgebung (Cleanbench) zum Agar gegeben. Nochmals gut mischen (Rührfisch oder Schwenken).

MC-Agar (MacConkey-Agar)

D-(+)-Lactose 10 g ad
ddH₂O 100 ml (10%ige Lactoselösung)

Lactose im 250-ml-Erlenmeyerkolben in ddH₂O lösen, deckeln und zum Autoklavieren geben. Wahlweise kann die Lösung auch unter der Cleanbench mittels Spritze und Filter steril filtriert werden.

MacConkey-Fertigpulver 40 g ad
ddH₂O 900 ml (1,35%iger Agar)

Im ausreichend großen Meßzylinder mit Rührfisch auf Magnetrührgerät gut mischen, in einen Erlenmeyerkolben umfüllen und zum Autoklavieren geben. Danach die ebenfalls autoklavierte Lactoselösung in steriler Umgebung zugeben und nochmals mischen. Der MacConkey-Agar ist 1%ig für D-(+)-Lactose.

II.E Puffer und Lösungen

Mit Ausnahme der Laufpuffer für die Agarosegelelektrophorese werden alle Puffer und Lösungen autoklaviert. Wenn Lösungen nicht autoklaviert werden sollen, ist das explizit angegeben.

Stocklösung 50x-TAE (Tris-Acetat-EDTA) → 1 l

Tris-Base 242 g
 Essigsäure (99,7 %ig)..... 57,1 ml
 EDTA 0,5 M (pH 8,0) 100 ml
 Mit ddH₂O auffüllen auf..... 1 l

Stocklösung 10x-TBE (Tris-Borat-EDTA) → 1 l

Tris-Base 108,0 g
 Borsäure 55,0 g
 EDTA-Na₂..... 9,3 g
 Mit ddH₂O auffüllen auf..... 1 l

Stocklösung 5 M NaCl → 1 l

NaCl-Salz 292,2 g
 Mit ddH₂O auffüllen auf..... 1 l

Stocklösung 1 M TrisHCl (pH 7,5) → 1 l

Tris-Base 121,2 g
 Mit ddH₂O auffüllen auf..... 1 l
 (Mit konz. NaOH oder mit konz. HCl den pH auf 7,5 einstellen!)

Stocklösung 0,5 M EDTA (pH 7,5 + pH 8,0) → 1 l

EDTA-Na₂..... 186,12 g
 Mit ddH₂O auffüllen auf..... 1 l
 (Mit konz. NaOH oder mit konz. HCl den pH auf 7,5 bzw. 8,0 einstellen!)

Stocklösung 100 mM MgCl₂ → 100 ml

MgCl₂..... 2,03 g
 Mit ddH₂O auffüllen auf..... 100 ml

Stocklösung 1 M DTT (Dithiothreitol) → 5 ml

DTT (MG=154,2)..... 771 mg
 Mit ddH₂O auffüllen auf..... 5 ml
 (Nicht autoklavieren! Steril filtrieren! Aufbewahrung im Gefrierfach!)

1x-TAE (Tris-Acetat-EDTA, Laufpuffer) → 1 l

50x-TAE..... 20 ml ad
 ddH₂O 980 ml

6x-Stop-Puffer

In die gewünschte Menge ddH ₂ O hineingeben:	Für 10 ml:
Bromphenolblau..... 0,25 %	25,0 mg
Xylencyanol FF 0,25 %	25,0 mg
Ficoll (Type 400) 25,00 %	2,50 g

II. Materialien

0,5x-TBE (Tris-Borat-EDTA, Laufpuffer) → 1,5 l

10x-TBE..... 75 ml ad
ddH₂O..... 1425 ml

0,5x-TBE (Tris-Borat-EDTA, Laufpuffer) → 100 ml

10x-TBE..... 75 ml ad
ddH₂O..... 1425 ml

SE (Salt-EDTA) → 1 l

5 M NaCl..... 15 ml
0,5 M EDTA (pH 7,5) 50 ml ad
ddH₂O..... 935 ml
(75 mM NaCl + 25 mM EDTA (pH 7,5))

TE (Tris-EDTA) → 1 l

1 M Tris-HCl (pH 7,5)..... 10 ml
0,5 M EDTA (pH 7,5) 10 ml ad
ddH₂O..... 980 ml
(10 mM TrisHCl (pH 7,5) + 5 mM EDTA (pH 7,5))

LGT-Agarosepuffer (für die Pulsfeldgelelektrophorese) → 100 ml

1 M TrisHCl (pH 7,5)..... 1 ml
100 mM MgCl₂ 1 ml
0,5 M EDTA (pH 7,5) 20 µl
Mit ddH₂O auffüllen auf..... 100 ml
(10 mM TrisHCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl₂ + 0,1 mM EDTA (pH 7,5))

NDS-Puffer (für die Reinigung der Pulsfeldblöckchen) → 500 ml

EDTA-Na₂..... 186,12 g
N-Lauroylsarcosin..... 5 g
Mit ddH₂O auffüllen auf..... 500 ml
(0,5 M EDTA (pH 9,5) + N-Lauroylsarcosin (1%ig))
(Mit konz. NaOH oder mit konz. HCl den pH auf 9,5 einstellen!)

NEBa-Vorpuffer → 100 ml (entspricht dem BioLabs® Spaltpuffer für PFGE)

5 M NaCl..... 1 ml
1 M TrisHCl (pH 7,5)..... 1 ml
100 mM MgCl₂ 10 ml
1 M DTT (Di-thio-threitol) 100 µl
ddH₂O..... 87,9 ml
(50 mM NaCl + 10 mM TrisHCl (pH 7,5) + 10 mM MgCl₂ + 1 mM DTT)
(Mit konz. NaOH oder mit konz. HCl den pH auf 7,9 einstellen!)

^a Fa. New England BioLabs®

Die Lösung wird nicht autoklaviert. Sie wird unter sterilen Bedingungen (Cleanbench) durch einen Mikrofilter in 15-ml-Röhrchen steril filtriert. Der Puffer wird im Gefrierfach aufbewahrt und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut.

II.F Bakterienstämme

In nachfolgender Tabelle sind alle in dieser Arbeit benutzten *E. coli* Stämme gelistet.

Tabelle II.2: Verwendete *E. coli* Stämme

<i>E. coli</i> Stämme	Eigenschaft(en)	Referenz
DH5α <i>E. coli</i> K-12-Stamm	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk-</i> , <i>mk-</i>) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>argF-lac</i>)U169, λ ⁻ , φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15	Bethesda Research Laboratories, 1986
HB101 <i>E. coli</i> K-12-Stamm	F ⁻ , <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>hsdS20</i> (<i>hsr-</i> , <i>hsm-</i>), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>lacZ4</i> , <i>lenB6</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsL20</i> (SmR), <i>xyl-5</i> , <i>mtl.1</i> , λ ⁻ ,	Boyer & Roulland-Dussoix, 1969
MG 1655 <i>E. coli</i> K-12-Stamm	F ⁻ , λ ⁻ , <i>fim+</i>	Guyet et al., 1981
AAEC 110 <i>E. coli</i> K-12-Stamm	F ⁻ , λ ⁻ , <i>fim-</i>	Gally et al., 1993
536 UPEC ^a -Isolat	O6:K15:H31, <i>fim+</i> , <i>pap+</i> , <i>sfa+</i> , <i>hly+</i> , PAI I, II, III, IV ₅₃₆ ⁺	Berger et al., 1982
536-21 Mutante	PAI I ₅₃₆ ⁻ , PAI ₅₃₆ II ⁻	Hacker et al. 1983
J96 UPEC ^a -Isolat	O4:K6:H-, <i>fim+</i> , <i>pap+</i> , <i>foc+</i> , <i>hlyA+</i> , <i>cnf1+</i> , PAI I, II _{J96} ⁺ , <i>fyuA+</i>	Hull et al., 1981
IA2 UPEC ^a -Isolat	<i>pap+</i> , <i>fyuA+</i> , <i>sfa/foc+</i> , <i>iut+</i>	Johnson & Stell, 2000
P678-54/pAH1010	<i>nfa+</i>	Ahrens et al., 1993
PM9	O9:K34:H-, <i>fim+</i> , <i>bmaE+</i> , <i>gafD+</i> , <i>fyuA+</i> , <i>iut+</i> , <i>cva+</i>	Johnson & Stell, 2000
U5	O6:K53:H7, <i>fim+</i> , <i>pap+</i> , <i>sfa/foc+</i> , <i>hlyA+</i> , <i>cnf1+</i> , <i>fyuA+</i> , K5+, <i>ibeA+</i>	Johnson & Stell, 2000
V15	O1:K1:H7, <i>fim+</i> , <i>pap+</i> , <i>fyuA+</i> , <i>iut+</i> , <i>cva+</i>	Johnson & Stell, 2000
V27	O2:K5:H1, <i>fim+</i> , <i>pap+</i> , <i>sfa/foc</i> , <i>cdt+</i> , <i>fyuA+</i> , <i>iut+</i> ,	Johnson & Stell, 2000
IHE 3034 NBM ^b -Isolat	O18:K1:H7/9, <i>fim+</i> , <i>sfall+</i> , <i>hly-</i> , <i>fyuA+</i>	Korhonen et al., 1985

^aUPEC = Uropathogene *E. coli*

^bNBM = Neugeborenen-Meningitis

II. Materialien

II.G Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide sind von der Fa. MWG-Biotech bezogen. Alle gelieferten Primer-Caps mit den getrockneten, gefrorenen Oligonukleotiden sind mit ddH₂O so gelöst worden, daß sie in einer Konzentration von 100 pmol pro µl vorliegen. Im folgenden sind die benutzten Primer tabellarisch gelistet.

Tabelle II.3: Oligonukleotide für die Einzel-PCR (→ IV. Methoden)

Primer	Sequenz 5' → 3'	Prod.- Größe [bp]	Gen	Kontrollstamm		Referenz
				positiv	negativ	
RTX6II-R	TCT GAA TTC TGA TTA GAG ATA TCA CCT GAC TC	680	<i>hlyA</i>	J96	MG 1655	Kuhnert et al., 1997
RTX6II-L	TAT GAA TTC ACT CAT ATC AAT GG					
3	GTG CAG ATT AAC ATC AGG GG	430	<i>prsF/ papF (pap)</i>	J96	MG 1655	Öschlärer A. (IMI Labor; nicht publizierte Daten)
4	ATG CTC ATA CTG GCC GTG GT					
21	CCC GTT GGA TTG GCT GGT GG	395	K1	IHE 3034	MG 1655	Öschlärer A. (IMI Labor; nicht publizierte Daten)
22	CCT TGC CCC TCT TTG TTA AG					
ECK1B-R	GCG GAA TTC GCA TTG ATG CTG CGA TAG	840	<i>neuA/ neuC (K1)</i>	IHE 3034	MG 1655	Zapata et al., 1989 & 1992
ECK1B-L	GCG GAA TTC ATT GGA CAC TCG CTG TTT G					
fyuA-FP	GCG ACG GGA AGC GAT TTA	780	<i>fyuA</i>	536	MG 1655	Schubert et al., 1998
fyuA-RP	CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA					

Tabelle II.4: Oligonukleotid für die Rep-PCRs (→ IV. Methoden)

Primer	Sequenz 5' → 3'	Prod.- Größe [bp]	Gen	Kontrollstamm		Referenz
				positiv	negativ	
Rep1R-I	III ICG ICG ICG TCI GGC ^a	I.d.R. mehrere Prod. unterschiedlicher Größe.	Unspezifisch ! Verschiedene DNA- Fragmente.	Kein Stamm ! Elektrophorese- Muster verschie- dener Stämme werden miteinander verglichen. (DNA-Fingerprint)		Versalovic et al., 1991 Woods et al., 1993

^aI = Inosin

Tabelle II.5: Oligonukleotide für die MP-PCRs des Pools 1 (→ IV. Methoden)

Primer	Sequenz 5' → 3'	Prod.- Größe [bp]	Gen	Kontrollstamm		Referenz
				positiv	negativ	
RPAi f	GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A	930	PAI	J96	AAEC 110	Johnson & Stell, 2000
RPAi r	TCG CCA CCA ATC ACA GCC GAA C					
PapA f	ATG GCA GTG GTG TCT TTT GGT G	720	<i>pap</i> AH	J96	AAEC 110	Johnson & Stell, 2000
PapA r	CGT CCC ACC ATA CGT GCT CTT C					
FimH f	TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG	508	<i>fimH</i>	J96	AAEC 110	Johnson & Stell, 2000
FimH r	GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA					
KpsIII f	TCC TCT TGC TAC TAT TCC CCC T	392	<i>kps</i> MT III	J96	AAEC 110	Johnson & Stell, 2000
KpsIII r	AGG CGT ATC CAT CCC TCC TAA C					
PapEF f	GCA ACA GCA ACG CTG GTT GCA TCA T	336	<i>papEF</i>	J96	AAEC 110	Yamamoto et al., 1995
PapEF r	AGA GAG AGC CAC TCT TAT ACG GAC A					
ibe10 f	AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC	170	<i>ibeA</i>	U5	AAEC 110	Huang et al., 1995
ibe10 r	TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC					Johnson & Stell, 2000

Tabelle II.6: Oligonukleotide für die MP-PCRs des Pools 2 (→ IV. Methoden)

Primer	Sequenz 5' → 3'	Prod.- Größe [bp]	Gen	Kontrollstamm		Referenz
				positiv	negativ	
FyuA f'	TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA	880	<i>fyuA</i>	PM9, IA2, V15	MG 1655	Johnson & Stell, 2000
FyuA r	CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA					Schubert et al., 1998
bmaE-f	ATG GCG CTA ACT TGC CAT GCT G	507	<i>bmaE</i>	PM9	MG 1655	Johnson & Stell, 2000
bmaE-r	AGG GGG ACA TAT AGC CCC TTC					
sfa1	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	410	<i>sfa</i> / <i>focDE</i>	IA2	MG 1655	Le Bouguenec et al., 1992
sfa2	CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A					
AerJ f	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G	300	<i>iutA</i>	PM9, IA2, V15	MG 1655	Johnson et al., 1998
AerJ r	CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG					
AlleleIII-f	GGC CTG GCA ATG GAT TTA CCT GG	258	<i>papG</i> Allel III	J96, IA2, V15	MG 1655	Johnson & Brown, 1996
AlleleIII-r	CCA CCA AAT GAC CAT GCC AGA C					
K1-f	TAG CAA ACG TTC TAT TGG TGC	153	K1	V15	MG 1655	Johnson & Stell, 2000
kpsII r	CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA					

II. Materialien

Tabelle II.7: Oligonukleotide für die MP-PCRs des Pools 3 (→ IV. Methoden)

Primer	Sequenz 5' → 3'	Prod.-Größe [bp]	Gen	Kontrollstamm		Referenz
				positiv	negativ	
hly f	AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T	1177	<i>hlyA</i>	J96	MG 1655	Yamamoto et al., 1995
hly r	ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A					
rfc-f	ATC CAT CAG GAG GGG ACT GGA	788	<i>rfc</i>	J96	MG 1655	Johnson & Stell, 2000
rfc-r	AAC CAT ACC AAC CAA TGC GAG					
nfaE-f	GCT TAC TGA TTC TGG GAT GGA	559	<i>nfaE</i>	P678-54/ pAH1010	MG 1655	Johnson & Stell, 2000
nfaE-r	CGG TGG CCG AGT CAT ATG CCA					
AlleleI-f	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT	461	<i>papG</i> Allel I	J96	MG 1655	Johnson & Brown, 1996
AlleleI-r	TGG CAT CCC CCA ACA TTA TCG					
kpsII f	GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG	272	<i>kps</i> MT II	V27	MG 1655	Johnson & Stell, 2000
kpsII r	CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA					
PapC f	GTG GCA GTA TGA GTA ATG ACC GTT A	200	<i>papC</i>	V27, J96	MG 1655	Johnson & Stell, 2000, Le Bouguenec et al., 1992
PapC r	ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A					

II.H Größenmarker

Größenmarker werden bei der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel benutzt, um die DNA-Fragment-Längen identifizieren zu können. Die Größenmarker sind standardisierte Gemische aus DNA-Fragmenten bestimmter Länge in bestimmter Menge und ergeben immer das gleiche Bild. Die Angaben sind jeweils aus den im Lieferumfang beiliegenden Produktbegleitschreiben entnommen. Siehe dazu auch Kapitel IV. Methoden.

MassRuler™ TM, DNA Ladder, Mix (Fa. MBI Fermentas®)

Diese DNA-Leiter wurde für die Gelelektrophorese der DNA-Fragmente aus der MP-PCR benutzt. Die Besonderheit dieses Größenmarkers ist, daß man mit ihm auch eine grobe quantitative Bestimmung des DNA-Fragments in Abhängigkeit zum in die Geltaschen eingesetzten Volumen durchführen kann. Außerdem eignet er sich für kleine DNA-Fragmente (MG < 250 bp), weil er im Gegensatz zum GeneRuler™ (s.u.) eine 200-, 100- und 80-bp-Bande liefert.

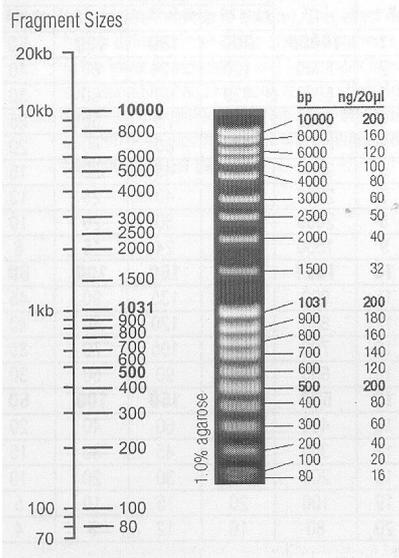


Abbildung II.1: MassRuler-Banden

	Fragment, bp	Quantity, ng			
		in 20 µl	in 15 µl	in 10 µl	in 5 µl
1	10000	200	150	100	50
2	8000	160	120	80	40
3	6000	120	90	60	30
4	5000	100	75	50	25
5	4000	80	60	40	20
6	3000	60	45	30	15
7	2500	50	40	25	13
8	2000	40	30	20	10
9	1500	32	24	16	8
10	1031	200	150	100	50
11	900	180	135	90	45
12	800	160	120	80	40
13	700	140	105	70	35
14	600	120	90	60	30
15	500	200	150	100	50
16	400	80	60	40	20
17	300	60	45	30	15
18	200	40	30	20	10
19	100	20	15	10	5
20	80	16	12	8	4

Abbildung II.2: DNA-Menge [ng] in jeder Bande

GeneRuler™, 1kb DNA Ladder (Fa. MBI Fermentas®)

Diese DNA-Leiter wurde für die Gelelektrophorese der DNA-Fragmente aus den einzelnen Kontroll-Polymerasekettenreaktionen benutzt.

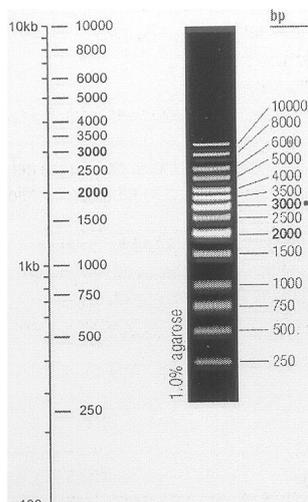


Abbildung II.3: GeneRuler-Banden

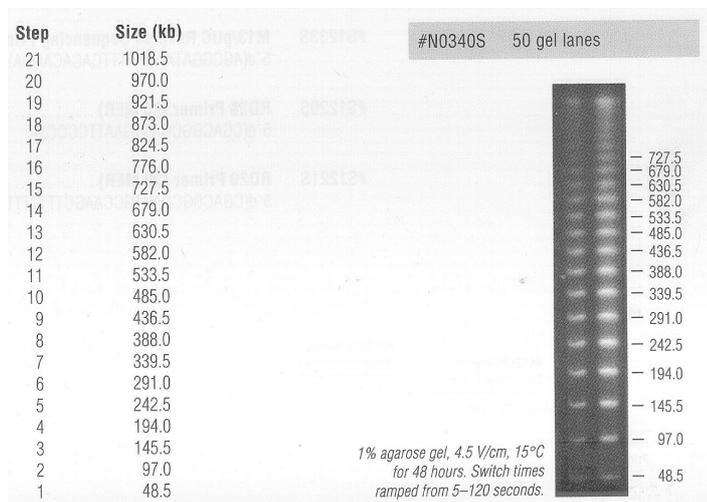


Abbildung II.4: Lambda-PFG-Marker-Banden

Lambda Ladder PFG-Marker #340 (Fa. N. E. BioLabs®)

Diese DNA-Leiter, die in Abbildung II.4 dargestellt ist, wurde für die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) benutzt.

III. Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind, soweit nicht explizit anders angegeben, aus den Publikationen von J. Sambrook, E. Bast und H. G. Gassen und G. Schrimpf entnommen (Sambrook et al., 1989; Bast, 2001; Gassen und Schrimpf, 1999).

III.A Vorarbeiten

Durchführung des Drei-Ösen-Ausstrichs (Anlegen einer Agarplattenkultur)

Auf eine LB-Agarplatte (→ II. Materialien) wird eine gepickte Kolonie (von einem festen Nährboden) oder Impföse (aus einem Flüssig-Nährmedium) mit einer vorher abgeflamnten Impfschlinge ausgestrichen. Durch zwei weitere Ausstriche auf derselben Platte mit zwischenzeitlichem Abflammen der Öse sollen nach Inkubation über Nacht bei 37°C Einzelkolonien entstehen. Aufbewahrung im Kühlschrank für ca. 4 bis 6 Wochen möglich. Steriles Arbeiten unter der Cleanbench!

Animpfen einer Über-Nacht-Kultur (ÜN)

In 3-5 ml LB-Medium (→ II. Materialien), das vorher in ein Kulturröhrchen pipettiert wurde, wird eine Bakterienkolonie (mit sterilem Zahnstocker gepickt) eingebracht und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Kurzzeitige Aufbewahrung im Kühlschrank möglich. Steriles Arbeiten unter der Cleanbench!

Gewinnung von *E. coli* Isolaten aus Stuhl- bzw. Urinproben

Es wird eine Verdünnungsreihe der Proben bis 10^{-8} hergestellt: Je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8} werden auf MacConkey-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. (Mit einem Drigalski-Spatel ausplattieren bis die Nährbodenoberfläche trocken ist!) - MacConkey-Platten sind Selektivnährböden für gram-negative Enterobakterien. Sie eignen sich zur Isolierung von Salmonellen, Shigellen und coliformen Bakterien. Lactose vergärende *E. coli* Bakterien zeigen rote Kolonien. - Am nächsten Tag werden dann je sechs Klone (ausgewählte Einzelkolonien) gepickt und jeweils auf eine LB-Agarplatte mit einem 3-Ösen-Ausstrich aufgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von dieser Agarplatte wird am nächsten Tag eine Kolonie gepickt und eine Über-Nacht-Kultur im Schüttler angesetzt, um eine Glycerinkultur anzulegen. 1 ml ÜN-Kultur wird am nächsten Tag mit 300 µl Glycerin (1 M, autoklaviert) gemischt. Anschließend wird die Glycerinkultur in einem Gefrierschrank bei -80°C dauerhaft aufbewahrt (Jena-Stammsammlung). Alle Arbeiten erfolgen ausschließlich unter sterilen Bedingungen (Cleanbench!).

III.B Phänotypische Untersuchungen

1. Nachweis von α -Hämolysin (Hämolysen auf Humanblutagar)

Dieser Test prüft den *E. coli* Stamm auf die Fähigkeit zur Produktion von α -Hämolysin. α -Hämolysin wird in die Zellmembran von Erythrozyten eingelagert, bildet Poren und lysiert die Zellen. Die Hämolysinbildung läßt sich nachweisen, indem man den zu testenden Stamm (mit z.B. sterilisierten Zahnstochern) auf Blutagarplatten sticht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hämolytische Stämme zeigen einen sehr charakteristischen, hellen Hämolysenhof, der die Kolonien kreisförmig umgibt und besonders gut im Gegenlicht sichtbar wird. Hämolysenhöfe können unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Positivkontrolle: UPEC-Stamm 536

Negativkontrolle: *E. coli* K-12-Stamm DH5 α

2. Nachweis von P-Fimbrien (Hämagglutination mit Humanblut)

Dieser Test (nach Jones und Rutter, 1974) prüft *E. coli* Stämme auf die Fähigkeit zur Produktion von P-Fimbrien. P-Fimbrien spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Harnwegsinfektionen (HWI). Sie vermitteln die Anheftung des Bakteriums an die entsprechende Wirtszelle, die den benötigten α -D-Galp-(1-4)- β -D-Galp-Rezeptor trägt.

Blut-Wasch-Schritte: Zuerst wird eine ausreichende Menge (2 ml) des steril entnommenen Blutes mit sterilem 0,9%igem NaCl gewaschen: Das Blut für 5 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugieren, Überstand vorsichtig abnehmen (und werfen), mit sterilem 0,9%igem NaCl wieder bis zur Ausgangsmenge (2 ml) überschichten, vorsichtig mischen und wieder unter o.g. Bedingungen abzentrifugieren. Diese Schritte so lange wiederholen bis der Überstand klar ist (ca. 3-4 x). Zuletzt nochmals mit sterilem 0,9%igem NaCl bis zur Ausgangsmenge (2 ml) auffüllen und vorsichtig mischen.

Die so gewaschene Erythrozytenlösung (aus Humanblut) wird ca. 1:10 in sterilem 0,9%igem NaCl verdünnt. Von dieser Lösung gibt man einen Tropfen (ca. 20 μ l) auf einen Glasobjektträger und reibt dann mit einem sterilen Zahnstocher den zu testenden Bakterienstamm (eine Kolonie von einer LB-Agarplatte) ein. Man legt den Objektträger ca. 5 Minuten auf Eis. Danach erkennt man im Vergleich zu der Positiv- und Negativkontrolle (möglichst auf demselben Objektträger), welcher Stamm hämagglutiniert. Bei hämagglutinations-positiven Stämmen zeigt sich eine Verklumpung der Erythrozyten.

Positivkontrolle: UPEC-Stamm 536

Negativkontrolle: *E. coli* K-12-Stamm DH5 α oder HB101

3. Nachweis von S-Fimbrien (Hämagglutination mit Rinderblut)

Dieser Test (nach Jones und Rutter, 1974) prüft *E. coli* Stämme auf die Fähigkeit zur Produktion von S-Fimbrien. S-Fimbrien vermitteln die Anheftung an die entsprechenden Wirtszellen. Sie binden an sialinsäurehaltige α -Sialyl-2,3- β -Galactose-Rezeptoren. Dieser Test wird analog dem Test für P-Fimbrien (s.o.) mit Rinderblut durchgeführt.

Positivkontrolle: UPEC-Stamm 536

Negativkontrolle: *E. coli* K-12-Stamm DH5 α oder HB101

4. Nachweis von Typ-1-Fimbrien (Hefeagglutination)

Dieser Test (nach Orskov und Orskov, 1983) weist spezifisch Typ-1-Fimbrien durch mannosesensitive Agglutination mit *Saccharomyces cerevisiae* nach.

Man stellt mit sterilem 0,9%igem NaCl und mit frischer Bäckerhefe zwei Röhrchen oder Caps einer Stammlösung her (10 mg/ml *Saccharomyces cerevisiae*). Aus einer der beiden Suspensionen stellt man mit einer 10%igen Mannose-Stocklösung eine 2%ige mannosehaltige Hefesuspension her.

Auf einem Glasobjektträger mischt man nun jeweils einen Tropfen (ca. 20 μ l) der Suspension ohne Mannose mit einem Tropfen der vortags angesetzten Über-Nacht-Kultur des zu testenden *E. coli* Stammes. Ebenso verfährt man mit der mannosehaltigen Suspension. Nachdem durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt wurde, betrachtet man den Objektträger mit den beiden Tropfen unter leichtem Schwenken im Licht gegen einen dunklen Hintergrund. Bilden sich hierbei im ersten Tropfen (ohne Mannose) kleine Klümpchen, die sich nicht mehr verrühren lassen, während in dem zweiten Tropfen (mit Mannose) nichts (oder zumindest eindeutig weniger) agglutiniert, so ist die Agglutination positiv.

Mannose blockiert den Heferezeptor, der von Typ-1-Fimbrien zum Andocken an die Hefe benötigt wird. Solche Rezeptoren sind Glycoproteine mit Oligomannoseketten. Der Trisaccharid-Rezeptor α -D-Manp-(1-3)- β -D-Manp-(1-4)-D-GlcNAc wird bevorzugt.

Positivkontrolle: UPEC-Stamm 536

Negativkontrolle: *E. coli* K-12-Stamm AAEC 110

III.C Genotypische Untersuchungen

1. Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Methode der PCR (Saiki et al., 1988) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Mit Hilfe der PCR ist es *in vitro* möglich, von Nukleotidsequenzen enzymatisch millionenfach Kopien herzustellen (Amplifikation).

Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq aus Eubakterium *Thermus aquaticus*, Tth aus Eubakterium *Thermus thermophilus* oder Pwo aus Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* (v.a. bei RT-PCR)) synthetisiert ab dem 3'-Ende eines gewählten Startermoleküles (synthetisches Oligonukleotid, Primer), das vorher mit der einzelsträngig vorliegenden Matrize hybridisiert hat, einen neuen Nukleotidstrang. Durch ein zweites gewähltes Startermolekül, das am anderen Matrizenstrang hybridisiert und einen dem ersten Nukleotidstrang komplementären Strang in Gegenrichtung synthetisiert, entsteht ein DNA-Strang mit der Sequenz, die zwischen dem ersten (Forward-Primer) und dem zweiten (Reverse-Primer) Startermolekül liegt.

Tabelle III.1: Allgemeine Komponenten einer PCR (Mengen für ein 25- μ l-Volumen)

Komponenten	Menge / Konz.	Herkunft aus... / Stammlösung...
DNA-Matrize	1 pg - 100 ng	entspr. aufbereitetes Template (DNA)
Reaktionspuffer	1 x	10 x Lösung (200 mM Tris-HCl ^a (pH 8,4) ^a + 500 mM KCl ^a)
MgCl ₂	0,5 - 5 mM	50 mM Lösung ^a
dNTP-Mix	0,1 - 0,5 mM	10 mM Lösung
Forward-Primer	10 - 50 pmol	20 μ M Lösung
Reverse-Primer	10 - 50 pmol	20 μ M Lösung
Taq-Polymerase	0,5 - 2,5 U	5U/ μ l ^a
ddH ₂ O	Restvolumen	Glas mit autoklaviertem, dest. H ₂ O

^a variiert

Tabelle III.2: PCR-Musterpipettierschema für einen Ansatz mit 50 μ l Volumen

Komponenten	Volumina
DNA-Matrize/Template	1,0 - 2,0 μ l
Reaktionspuffer, 10x	5,0 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 μ l
Forward-Primer (100 pmol/ μ l)	1,0 μ l
Reverse-Primer (100 pmol/ μ l)	1,0 μ l
Taq-Polymerase (5U/ μ l)	0,5 μ l
ddH ₂ O	39 - 38 μ l

Tabelle III.3: Allgemeines PCR-Programm (Allgemeine PCR-Bedingungen)

Schritte	Bezeichnung	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung (Einsträngigkeit)	3 - 5 Min	95 °C
2	Denaturierung	0,5 - 1 Min	95 °C
3	Annealing (Primer-Hybridisierung)	0,5 - 1 Min	T _m ^a - 5 °C
4	Polymerisation	0,5 - 1 Min	72 °C
5	Wiederholung der Schritte 2 bis 4: 25 - 35 x		
6	Polymerisation (v.a. für Klonierungen)	5 - 10 Min	72 °C
7	Thermostock sollte dauerhaft eingestellt sein auf		4 - 8 °C

^a T_m: Berechenbare Schmelztemperatur des DNA-Doppelstranges
(Bis zu 25 bp des Stranges gilt: 1 GC-Paar = 4 °C und 1 AT-Paar = 2 °C)

Der Hauptgrund für die große Produktmenge ist die zyklische Wiederholung der folgenden Schritte: (1.) *Denaturierung*: die Matrize wird einzelsträngig, (2.) *Annealing*: die Primer hybridisieren mit der Matrize und (3.) *Polymerisation*: die Synthetisierung des DNA-Stranges. Dadurch wird ein exponentielles Wachstum der Produkte erreicht, da jeder neu entstandene DNA-Strang wieder als Matrize dienen kann. Alle PCR-

III. Methoden

Produkte können für kürzere Zeiträume im Kühlschrank (4°C) und für längere Zeiträume im Gefrierfach (-18°C) aufbewahrt werden.

Herstellung von Matrizen (Templates für die PCR)

In ein steriles Cap mit Schraubdeckel wird 120 µl ddH₂O (autoklaviert) gegeben. Man nimmt von einer tags zuvor ausgestrichenen LB-Agarplatte mit einer 20-µl-Pipette vorsichtig eine Einzelkolonie ab und suspendiert sie in das Cap. Das Cap wird bei 95°C für 10 Minuten gekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Verwendung immer nur auf Eis! Aufbewahrung im Gefrierfach (- 18°C).

Amplifikation von DNA (Einzel-PCR)

Hierbei wird nur ein Primerpaar benutzt, um ein einziges Produkt zu bekommen. Das Produkt ist spezifisch für eine vorhandene DNA-Sequenz (meist ein Gen bzw. einen spezifischen Abschnitt eines Genes). Diese Methode wurde in dieser Arbeit zur Verifizierung der Ergebnisse der Multiplex-PCR (s.u.) verwendet. Hierfür wird das Taq-DNA-Polymerase-Kit (5U/µl) sowie das dNTP-Set von GibcoBRL® (Fa. Life Technologies) benutzt. Alle Einzel-PCRs wurden nach dem oben beschriebenen Schema pipettiert (s. Tabelle III.2). PCR-Bedingungen der Einzel-PCRs:

Tabelle III.4: PCR-Bedingungen für Primer RTX6II-R und RTX6II-L (Nachweis von *hlyA*)

Denaturierung	3 Min	94 °C	30x
Denaturierung	30 Sek	94 °C	
Annealing	30 Sek	52 °C	
Polymerisation	1 Min	72 °C	
Polymerisation	7 Min	72 °C	

Tabelle III.5: PCR-Bedingungen für Primer 3 und 4 (Nachweis von *prsF/papF*)

Denaturierung	5 Min	95 °C	30x
Denaturierung	1 Min	95 °C	
Annealing	20 Sek	58 °C	
Polymerisation	20 Sek	72 °C	
Polymerisation	7 Min	72 °C	

Tabelle III.6: PCR-Bedingungen für Primer 21 und 22 (Nachweis von K1)

Denaturierung	5 Min	95 °C	30x
Denaturierung	1 Min	95 °C	
Annealing	30 Sek	54 °C	
Polymerisation	25 Sek	72 °C	
Polymerisation	7 Min	72 °C	

Tabelle III.7: PCR-Bedingungen für Primer ECK1B-R und ECK1B-L (Nachweis von K1)

Denaturierung	5 Min	94 °C	30x
Denaturierung	30 Sek	94 °C	
Annealing	30 Sek	52 °C	
Polymerisation	1 Min	72 °C	
Polymerisation	7 Min	72 °C	

Tabelle III.8: PCR-Bedingungen für Primer *fyuA*-FP und *fyuA*-RP (Nachweis von *fyuA*)

Denaturierung	3 Min	95 °C	30x
Denaturierung	45 Sek	95 °C	
Annealing	45 Sek	60 °C	
Polymerisation	1 Min	72 °C	
Polymerisation	5 Min	72 °C	

Multiplex-PCR (MP-PCR)

Die Besonderheit dieses PCR-Verfahrens (nach Johnson und Stell, 2000) ist die Kombination von mehreren (hier: 6) Primerpaaren in einem Ansatz unter denselben Amplifikationsbedingungen, d.h. man amplifiziert mehrere DNA-Abschnitte auf ein Mal, erhält mehrere Produkte verschiedener Größe und sieht in der Gelelektrophorese dementsprechend mehrere Banden (Henegariu et al., 1997). Es wird auch hier das Taq-DNA-Polymerase-Kit (5U/µl) sowie das dNTP-Set von GibcoBRL® (Fa. Life Technologies) benutzt. Insgesamt werden drei MP-Primer-Poole á sechs Primerpaaren verwendet. Die MP-Primer-Poole sind aus folgender Tabelle zu ersehen:

Tabelle III.9: Primer-Pool 1,2 und 3 für die MP-PCR

MP-Primer-Pool 1		
Primerpaare	für Gen(bereich)	Pipettivorschrift
RPAi f und RPAi r	PAI	Alle 6 Primerpaare verdünnen: 1:100 (Konzentration: 1 pmol/µl) Beispiel für 1 ml Primer-Pool: Je 10 µl jedes Primers (= 120 µl) plus 880 µl ddH ₂ O
PapA f und PapA r	<i>papAH</i>	
FimH f und FimH r	<i>fimH</i>	
KpsIII f und KpsIII r	<i>kpsMT III</i>	
PapEF f und PapEF r	<i>papEF</i>	
ibe10 f und ibe10 r	<i>ibeA</i>	
MP-Primer-Pool 2		
Primerpaare	für Gen(bereich)	Pipettivorschrift
FyuA f' und FyuA r	<i>fyuA</i>	(s.o.)
bmaE-f und bmaE-r	<i>bmaE</i>	
sfa1 und sfa2	<i>sfa/focDE</i>	
AerJ f und AerJ r	<i>iutA</i>	
AlleleIII-f und AlleleIII-r	<i>papG</i> Allel III	
K1-f und kpsII r	K1	
MP-Primer-Pool 3		
Primerpaare	für Gen(bereich)	Pipettivorschrift
hly f und hly r	<i>hlyA</i>	(s.o.)
rfc-f und rfc-r	<i>rfc</i>	
nfaE-f und nfaE-r	<i>nfaE</i>	
AlleleI-f und AlleleI-r	<i>papG</i> Allel I	
kpsII f und kpsII r	<i>kpsMT II</i>	
PapC f und PapC r	<i>papC</i>	

III. Methoden

Tabelle III.10: 50- μ l-Ansatz für MP-PCR

Template	1,0 - 7,0 μ l
10x-PCR-Puffer ^a (ohne Mg)	5,0 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 μ l
MP-Primer-Pool 1, 2 und 3 ^b	20,0 μ l
Taq-DNA-Polymerase (5U/ μ l)	0,5 μ l
ddH ₂ O	21,0 - 15,0 μ l

^a 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) + 500 mM KCl

^b Alle Primer sind 0,4 μ M benutzt

Tabelle III.11: Bedingungen für MP-PCR

Denaturierung	5 Min	94 °C	32x
Denaturierung	30 Sek	94 °C	
Annealing	30 Sek	63 °C	
Polymerisation	3 Min	68 °C	
Polymerisation	10 Min	72 °C	

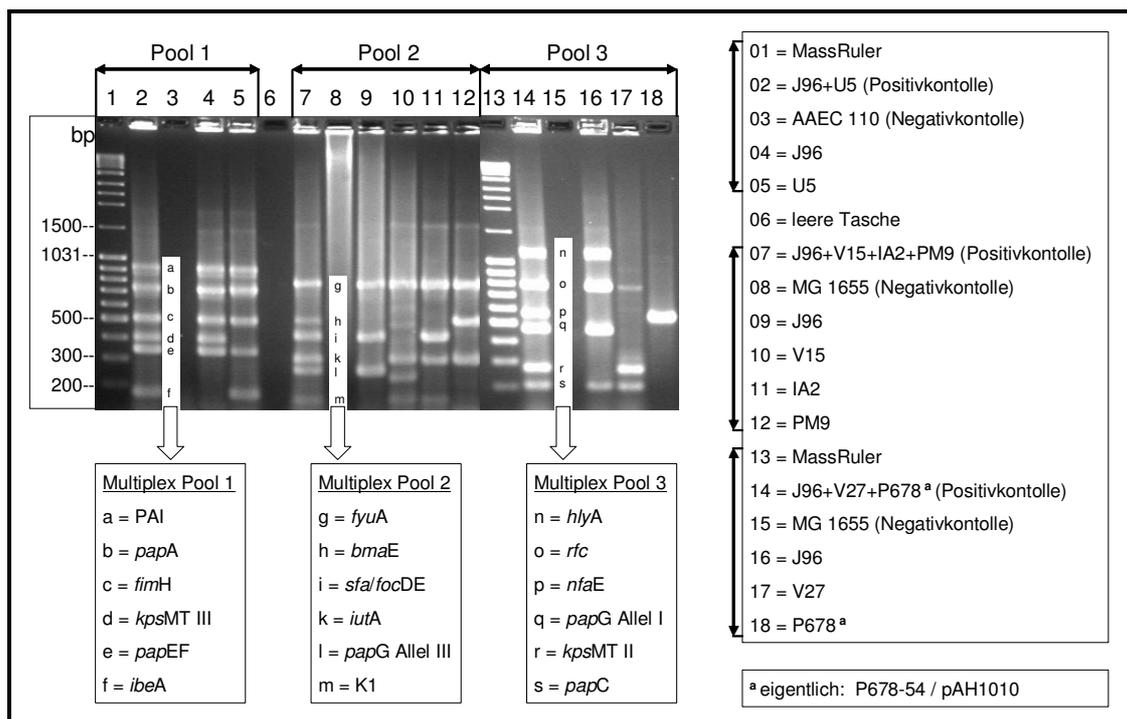


Abbildung III.1: Elektrophorese-Gel aller MP-PCR-Kontrollstämme

Die Abbildung zeigt die PCR-Bandenmuster aller Kontrollstämme, die bei der Multiplex-PCR Verwendung fanden, in einem Elektrophoresegel zusammen dargestellt.

Rep-PCR

Bei dieser PCR-Methode wird nur ein relativ kurzer, unspezifischer Primer benutzt (Kein Primerpaar!). Der Primer soll an mehreren Stellen innerhalb der zu untersuchenden DNA binden und liefert deshalb in der gelelektrophoretischen Auftrennung i.d.R. (mehrere) Banden unterschiedlicher Größe. Dieses Bandenmuster kann dann mit anderen Bandenmustern, die unter den gleichen Bedingungen erzeugt wurden, verglichen werden. Man kann so eine grobe Verwandtschaftsbeziehung zwischen verschiedenen Bakterienstämmen herstellen (Versalovic et al., 1991; Woods et al., 1993). Es wurde das Taq-DNA-Polymerase-Kit (1U/ μ l) der Fa. Roche sowie das dNTP-Set GibcoBRL® der Fa. Life Technologies benutzt.

Tabelle III.12: Bedingungen für Rep-PCR

Denaturierung	7 Min	95 °C	30x
Denaturierung	30 Sek	90 °C	
Annealing	1 Min	40 °C	
Polymerisation	8 Min	65 °C	
Polymerisation	16 Min	65 °C	

Tabelle III.13: 50-µl-Ansatz für Rep-PCR

Template	1,0 - 4,0 µl
10x-PCR-Puffer ^a (ohne Mg)	5,0 µl
DMSO ^b (als Cosolvent)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	7,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2,0 µl
Rep-Primer Rep1-RI	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (1U/µl)	1,0 µl
ddH ₂ O	21,0 - 15,0 µl

^a 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) + 500 mM KCl

^b Dimethylsulfoxid, Fa. Sigma-Aldrich

Tabelle III.14: Relation zwischen DNA-Fragmentlänge und Agarosekonzentration

DNA-Fragmentlänge	Agarosekonzentration
0,1 - 2 kb	2,0 %
0,2 - 3 kb	1,5 %
0,4 - 6 kb	1,2 %
0,5 - 7 kb	0,9 %
0,8 - 10 kb	0,7 %
1 - 20 kb	0,6 %
5 - 60 kb	0,3 %

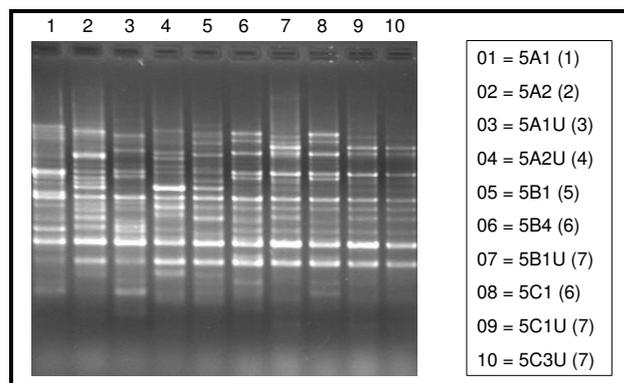


Abbildung III.2: Beispiel für ein Gel einer Rep-PCR

2. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wird die horizontale Agarosegelelektrophorese verwendet. Dabei wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode, wobei sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Agarosekonzentration wird nach der erwarteten Fragmentgröße gewählt. Die Relationen sind aus Tabelle III.14 ersichtlich. Höhermolekulare DNA-Fragmente, die größer als 20 kb sind, werden in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt.

Zur Herstellung des Agarosegels wird die Agarose in einem geeigneten Laufpuffer (80 - 200 ml je nach Taschenhöhe; gelkammerabhängig) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst ist. Nach Abkühlung auf ca. 40 bis 45 °C wird die Agarose in eine abgedichtete Gießvorrichtung gegossen und der Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel fest geworden ist, wird der Kamm herausgezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt. Die Kammer wird mit 1x-Laufpuffer gefüllt und das (Submarine-) Gel wird hineingelegt. Die Proben werden mit 6x-Stop-Puffer versetzt und in die Taschen, die der Kamm hinterlassen hat, vorsichtig eingebracht. Eine entsprechende Spannung und Stromstärke wird angelegt.

Nach erfolgter Elektrophorese kann die aufgetrennte DNA durch mindestens 15-minütige Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) (NUR Handschuhe aus Nitril-Kautschuk verwenden!) angefärbt und anschliessend unter UV-Licht analysiert und dokumentiert werden.

3. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Diese Methode wurde von Schwartz und Cantor zuerst benutzt. Sie dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten, die größer sind als 20 kb (Schwartz und Cantor, 1984; Birren et al., 1988).

Isolierung von High-Molecular-Weight-DNA (in Agaroseblöckchen)

➤ Zellen anreichern und waschen

Eine Über-Nacht-Kultur des betreffenden Stammes beimpfen und inkubieren. 2 ml der ÜN-Kultur werden in Eppendorf-Caps abzentrifugiert (1 Minute, 14.000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur). Der Überstand wird verworfen und man pipettiert erneut (bis zum Volumen von 2 ml) ÜN-Kultur des zu untersuchenden Stammes ins Cap dazu. Durch Aufziehen in die Pipettenspitze mischen. Erneutes Abzentrifugieren. Der klare Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Zell-Pellet wird in 1 ml SE-Puffer gelöst. Dieser letzte Waschschrift wird wiederholt. Anschließend wird die Suspension ein letztes Mal abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml SE-Puffer gelöst. (Kurz: 1x ÜN-Kultur anreichern, 2x Waschen, 1x Resuspendieren)

➤ Standardisierte optische Dichte herstellen

Aus dem Eppendorf-Cap werden 100 µl Zellsuspension in eine Meßküvette pipettiert, in die bereits 900 µl SE-Puffer vorgelegt wurden. Gegen eine Referenzküvette mit 1 ml SE-Puffer, die als Nullwert gebraucht wird, wird nun die optische Dichte der Zelllösung im Photometer bei 600 nm gemessen. Die optische Dichte OD_{600} soll zwischen 0,6 und 0,8 liegen. Ansonsten kann dieser Wert durch entsprechendes Verdünnen mit SE-Puffer oder durch entsprechendes Anreichern mit Bakteriensuspension erreicht werden.

➤ Gießformen und Agarose vorbereiten

Die Bakteriensuspension wird bei 37°C warm gehalten. Währenddessen werden die Schienen zum Gießen der Blöckchen mit 70%igem Ethanol gereinigt und zusammengesetzt. Ein Eppendorf-Cap wird zum Mischen von (Low-melting-) Agarose mit Bakterienlösung bereitgehalten (Beschriftung(en)!). Die Low-melting-Agarose wurde schon vorher als 2%ige Lösung mit LGT-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht

und danach im 40°C warmen Wasserbad gießfertig gehalten. Das Agaroseglas sollte handwarm sein.

➤ „Blöckchen gießen“ und Proteinase-K-Verdau ansetzen

Man mischt 900 µl der vorgewärmten Bakteriensuspension mit 900 µl der flüssigen LGT-low-melting-Agarose im Eppendorf-Cap und pipettiert das Gemisch sofort in die vorbereitete Schiene. Abkühlung bei Raumtemperatur oder besser im Kühlschrank.

Während die Agarose-Bakterien-Suspension in den Schienen fest wird, bereitet man pro Bakterienstamm 5 ml NDS-Puffer mit Proteinase K vor. Die Lösung soll 2 mg Proteinase K pro ml NDS-Puffer enthalten (2 mg/ml). 15-ml-Greiner-Röhrchen eignen sich als Gefäße. Standard-Plastikimpfösen eignen sich, um die Blöckchen zu fassen.

Nun öffnet man die Schiene vorsichtig, schneidet mit dem Skalpell die Blöckchen zurecht (ca. 3 mm x 4 mm), überführt diese in die NDS-Proteinase-K-Lösung und inkubiert im Wasserbad über Nacht bei 50°C unter vorsichtigem Schütteln.

➤ Waschen der Blöckchen (Proteinase K entfernen)

Am nächsten Tag wird die NDS-Proteinase-K-Lösung von den Blöckchen entfernt und durch 10 ml TE-Puffer ersetzt, den man nach kurzem und vorsichtigem Schütteln gleich noch einmal wechselt. Dann inkubiert man 2 Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Der TE-Puffer (immer 10 ml) wird noch 3 x nach jeweils 2 Stunden gewechselt (also 6 Stunden Schütteln insgesamt). Die Blöckchen sollten bis zur Weiterverarbeitung mind. 1 Woche in TE-Puffer ruhen. Der TE-Puffer wird am 3. oder 4. Tag nochmals ausgetauscht. Die Röhrchen mit den Blöckchen werden im Kühlschrank (4-8°C) in 10 ml TE-Puffer aufbewahrt und immer vor Wärme und Licht geschützt.

Spaltung von High-Molecular-Weight-DNA mit Restriktionsenzym *Xba*I

Ein kleines Blöckchen wird in einem 2 ml-Eppendorf-Cap mit 1 ml 1x-NEB-Vorpuffer versetzt und eine Stunde bei 50°C im Thermoblock inkubiert. Dann wird der Vorpuffer möglichst rückstandsfrei abpipettiert und durch 150 µl 1x-Spaltpuffer ersetzt.

Man gibt 20 Units *Xba*I-Enzym dazu (= 1 µl, Konz. 20.000 U/ml) und inkubiert das Cap bei 37°C über Nacht. Mit 1 Unit *Xba*I-Enzym kann 1 µg λ-DNA verdaut werden und zwar innerhalb einer Stunde bei 37°C in einem Volumen von 50 µl. Am nächsten Morgen werden nochmals 10 Units (= 0,5 µl) des Enzyms zugegeben und noch weitere 2-4 Stunden inkubiert. Danach werden 5 µl 6x-Stop-Puffer dazugegeben, um die Blöckchen anschließend in ein Agarosegel einzubetten.

III. Methoden

Tabelle III.15: Spaltpuffer für High-Molecular-Weight-DNA-Agaroseblöckchen

Bestandteile	Ansatz für 150 µl	Ansatz für 2 ml
10x-NEBuffer	15,0 µl	200 µl
100xBSA ^a -Puffer	1,5 µl	20 µl
ddH ₂ O	133,5µl	1780 µl

^a Bovines Serum Albumin

Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese

Man sollte sich die Agarosegellösung gießfertig vorbereitet haben: 100 ml 0,5x-TBE-Puffer mit 1,0 g Agarose (1,0%iges Gel) in der Mikrowelle aufkochen und nach vollständiger Auflösung in einem 40°C Wasserbad bis zum Gebrauch aufbewahren. Genauso sollte man sich den Laufpuffer (1,5 l 0,5x-TBE) für die Elektrophoresekammer schon früher herstellen und in die Kammer geben, weil der Puffer stark abgekühlt werden muß. Nun nimmt man das Blöckchen aus dem Cap und setzt es auf die Zahnspitze eines Kammes für die Gelkammer. Eine hauchdünne Scheibe des PFG-Markers (DNA-Leiter) wird daneben auf einen Zahn gesetzt. Der Kamm wird in die Gelkammer gesetzt und das Gel aus der handwarmen 1,0%igen Lösung gegossen. Wenn das Gel erkaltet und fest ist, wird es zusammen mit seiner Trägerplatte aus der Gelkammer genommen und in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Das Pulsfeldgerät der Fa. BIORAD „Electrophoresis Cell III“ wird im Block 1 auf eine Laufzeit von 19 Stunden bei 200 V (6,5 V/cm), einen Winkel von 120° und Pulszeiten von 5 auf 50 Sekunden eingestellt. Der Block 2 und 3 wird ausgeschaltet. Das Kühlgerät wird auf 12°C eingestellt und die Laufpufferpumpe wird auf den Wert 70 eingestellt, was einem Durchfluß von ca. einem Liter pro Minute entspricht.

Nach erfolgter Elektrophorese wird das Agarosegel in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) (NUR Handschuhe aus Nitril-Kautschuk verwenden!) angefärbt und anschließend unter UV-Licht analysiert und dokumentiert.

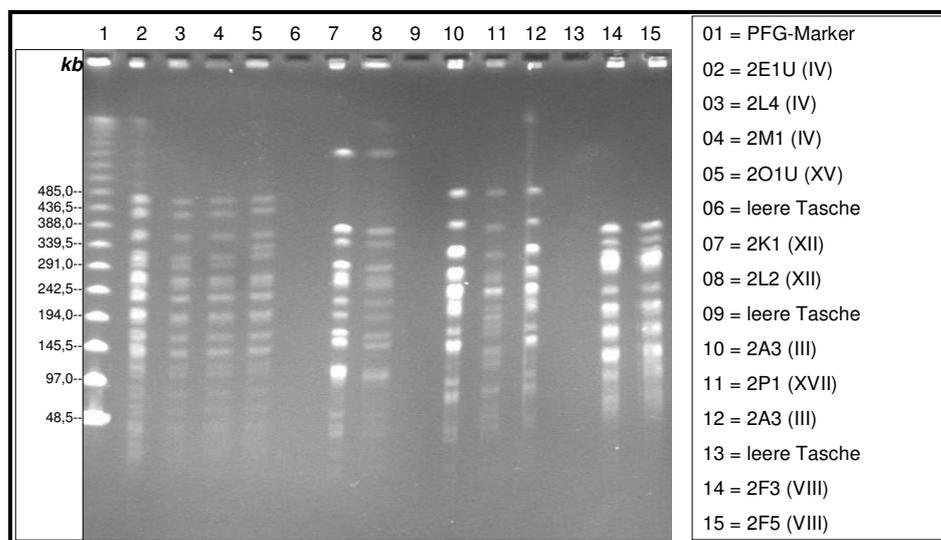


Abbildung III.3: Beispiel für ein Ergebnis-Gel einer Pulsfeldgelelektrophorese

IV. Ergebnisse

IV.A Einführung

In dieser Arbeit wurden insgesamt acht Patientinnen, die an chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden, über einen Zeitraum von zehn bis achtzehn Monaten beobachtet.

Die Patientinnen befanden sich in Behandlung bei Prof. Dr. Fünfstück am Universitätsklinikum Jena in der Nephrologischen Ambulanz. Prof. Dr. Fünfstück und seine Mitarbeiter haben bei den Untersuchungsterminen der Patientinnen in der Klinik eine Stuhl- und eine Urinprobe (Probenentnahme = PE) entnommen und uns anschließend zur Verfügung gestellt. Aus diesen Proben wurden im Institut für Molekulare Infektionsbiologie *Escherichia coli* Isolate angezüchtet (siehe Kapitel Methoden). Die Isolatbezeichnung setzt sich zusammen aus der Nummer der Patientin gefolgt von einem Buchstaben, der für das entsprechende Untersuchungsdatum steht, und einer weiteren, fortlaufenden Nummer für den *E. coli* Stamm dieses Datums. Wenn der Stamm aus einer Urinprobe isoliert wurde, wurde der Bezeichnung ein „U“ nachgestellt.

Tabelle IV.1: Patienteneckdaten für diese Arbeit

Patientennamen	Gesamtzahl aller Isolate	davon Stuhlisolate	davon Urinisolate	Gesamtzahl der definierten Klone	Klone innerhalb der Stuhlisolate	Klone innerhalb der Urinisolate	Klinisch aktive Phasen	Acimethin® - Therapie	Untersuchungstermine	Beobachtungszeitraum [Monate]	Erste Untersuchung	Buchstabencode	Letzte Untersuchung	Buchstabencode
1. Pat. 1 (CB)	62	31	31	26	16	13	0		7	18	16.12.98	L	14.06.00	R
2. Pat. 2 (HF)	50	17	33	17	9	12	0	Ja	8	15,5	16.12.98	L	29.03.00	S
3. Pat. 3 (CG)	61	27	34	29	17	13	0	Ja	7	17	18.11.98	P	12.04.00	V
4. Pat. 5 (EM)	25	12	13	6	4	3	0		4	11	19.05.99	D	19.04.00	G
5. Pat. 8 (US)	63	31	32	29	19	11	2	Ja	8	18,5	02.12.98	H	21.06.00	P
6. Pat. 11 (SH)	27	16	11	5	5	3	0		4	12,5	07.04.99	D	26.04.00	G
7. Pat. 22 (IH)	34	23	11	9	7	3	2	Ja	8	14,5	20.01.99	D	05.04.00	L
8. Pat. 29 (SJ)	31	10	21	9	4	6	0		5	10	25.08.99	A	28.06.00	E
Summe:	353	167	186	130	81	64	4	4	51					

Die Patientendaten sind institutsintern verschlüsselt. In Tabelle IV.1 finden sich die hier verwendeten Namen der Patientinnen, die Gesamtzahl an Isolaten pro Patientin, eine Aufgliederung in Stuhl- und Urinisolate und die Anzahl der Klone einer Patientin inklusive Unterteilung nach Stuhl- und Urinklonen. Außerdem findet sich die Anzahl

IV. Ergebnisse

von klinisch aktiven Phasen einer Patientin innerhalb der Studiendauer, für welche Patientin eine prophylaktische Dauertherapie mit Acimethin® bestand und schließlich die Anzahl der Untersuchungstermine selbst sowie der Beobachtungszeitraum (ungefähre Dauer des Zeitraumes in Monaten, erstes und letztes Datum aller einbezogenen klinischen Untersuchungen mit entsprechendem Buchstabencode für das jeweilige Untersuchungsdatum).

Die *E. coli* Isolate wurden sowohl phänotypisch als auch genotypisch auf das Vorliegen bestimmter Pathogenitätsfaktoren (PF) untersucht. Zur besseren Übersicht sind die untersuchten Eigenschaften tabellarisch zusammengestellt. Die folgende Tabelle listet die phänotypisch durchgeführten Untersuchungen auf.

Tabelle IV.2: Phänotypisch nachgewiesene Eigenschaften der gewonnenen *E. coli* Isolate

Abkürzung des Virulenzfaktors	Spezifischer Test prüft auf	Untersuchung
Hly	Hämolsinproduktion	Hämolysetest auf Blutagarplatten (Humanblut)
Pap/Prs	P-Fimbrien-Expression	Hämagglutinationstest (Humanblut)
Sfa	S-Fimbrien-Expression	Hämagglutinationstest (Rinderblut)
Fim	Typ-1-Fimbrien-Expression	Mannosesensitiver Hefeagglutinationstest

Genotypisch wurden die Isolate auf 18 Virulenzfaktoren (VF) mittels Multiplex-PCR (MP-PCR) getestet. Eine Übersicht über die geprüften Gene bzw. Gencluster gibt die Tabelle IV.3.

Alle Isolate innerhalb des Beobachtungszeitraumes für eine Patientin wurden einem Identitätsscreening mit Rep-PCR unterzogen. Anhand der genotypischen Ergebnisse und der Daten aus der Rep-PCR wurden Klone definiert. Wenn Isolate das gleiche Rep-Muster zeigten und gleichzeitig in allen 18 genotypischen Merkmalen übereinstimmten, wurden sie zu einem Klon zusammengefaßt. Die Klone wurden mit „KL“ bezeichnet und fortlaufend durchnummeriert. Vor der Klonbezeichnung steht die jeweilige Nummer der Patientin. Besonders zu beachten ist der Unterschied zwischen dem Begriff Isolat und dem Begriff Klon. Während ein Isolat nur aus Stuhl oder Urin stammen kann, kann ein und derselbe Klon *sowohl* in Stuhl *als auch* in Urin vorkommen.

Ausgewählte Klone wurden anschließend mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) untersucht. Die Untersuchung mit der PFGE dient in dieser Arbeit zur Bestätigung von Persistenzen und zur Suche nach DNA-Umlagerungen (Veränderungen der genomischen Struktur, z.B. als Bandenshift im Elektrophoresegel sichtbar). Für die PFGE wurde in dieser Arbeit ausschließlich das Restriktionsenzym *Xba*I

verwendet. Von Varianten wird in dieser Arbeit dann gesprochen, wenn Proben trotz genotypischer Unterschiedlichkeit dasselbe PFGE-Muster zeigen.

Tabelle IV.3: Genotypisch überprüfte Gene bzw. Gencluster der *E. coli* Isolate

Abkürzung der Gene bzw. Gencluster	Abkürzung steht für	Untersuchung auf
<i>hlyA</i>	hemolysin	α -Hämolysin (Protein der Transmembranpore)
<i>papA</i>	pyelonephritis associated pili	P-Fimbrien-Hauptuntereinheit (Hauptbaustein des Piluschaftes)
<i>papC</i>	pyelonephritis associated pili	P-Fimbrien-Biogenese (Initiation des Pilus-Zusammenbaus)
<i>papEF</i>	pyelonephritis associated pili	P-Fimbrien-Nebenuntereinheiten (Proteine der Pilusspitze)
<i>papG</i> Allel I	pyelonephritis associated pili	P-Fimbrien-Adhäsine, Klasse I
<i>papG</i> Allel III	pyelonephritis associated pili	P-Fimbrien-Adhäsine, Klasse III
<i>sfa/focDE</i>	S-fimbrial adhesin / F1C fimbriae	S-/F1C-Fimbrien (Biogenese-Moleküle)
<i>fimH</i>	type 1 fimbriae	Typ-1-Fimbrien-Adhäsine (Mannose-spezifisch)
K1	K1-antigene	K1 Kapsel (Serovarbezeichnung)
<i>kpsMT II</i>	capsule group II	ABC-Transporter (Subklasse, nötig für Transferase) bei Gruppe-II-Kapseln
<i>kpsMT III</i>	capsule group III	ABC-Transporter (Subklasse, nötig für Transferase) bei Gruppe-III-Kapseln
<i>fyuA</i>	ferric yersiniabactin uptake	Yersiniabaktin (Siderophoren-System), Teil der HPI (= <i>fyuA</i> + <i>irp2</i>)
<i>iutA</i>	iron uptake transport	Aerobaktin (Siderophoren-System), Membranrezeptorprotein
PAI	pathogenicity associated island	PAI-Marker des Stammes CFT073
<i>nfaE</i>	nonfimbrial adhesin-I	Adhäsine ohne Pilus (aus O83:K1:H4), Beteiligung an der Nfa-I-Expression
<i>ibeA</i> = <i>ibe10</i>	invasion of brain endothelium	Marker für einen Genlocus, der mit Meningitis assoziiert ist
<i>bmaE</i>	blood group M antigen	Marker für M-Fimbrien
<i>rfc</i>	O antigen polymerase	O-Antigen Polymerase (für die LPS-Komplex-Synthese)

Die Nomenklatur für die Bandenmuster aus Rep-PCR und PFGE wurde in dieser Arbeit vereinheitlicht, d.h. daß die Bandenmuster aus den Arbeiten von Brauchle (2002) und Maibaum (2003) mit den Ergebnissen dieser Arbeit abgeglichen und fortlaufend nummeriert wurden. Der Anhang enthält für jede Patientin ein tabellarisches Gesamtverzeichnis aller Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse, also auch die Ergebnisse der vorherigen Doktoranden.

IV.B Auswertung der einzelnen Patientinnen

Jeder Patientin ist ein eigenes Kapitel gewidmet. Im folgenden Text wird die Struktur und der Inhalt der einzelnen Patientenkapitel erläutert. Alle acht Einzelkapitel sind in die folgenden Überschriften gegliedert.

- **Phänotypische und genotypische Ergebnisse**
- **Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse**
- **Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor**

Zu Beginn eines jeden Patientenkapitels gibt eine Grafik einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Untersuchungen bei dieser Patientin. Die Abbildung gibt die wichtigsten Ergebnisse wieder. Es sei bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß sich im Anhang Tabellen finden, die alle Labordaten, die im Institut erhoben wurden, enthalten, inklusive der vergebenen Nummern für die Rep-PCR- und PFGE-Muster. Außerdem finden sich dazu Tabellen mit entsprechenden Daten aus den beiden zu Grunde liegenden „Vorgängerdissertationen“. Aus dieser Zusammenstellung geht dann auch die Nummer des Isolates in der sog. Jena-Stammsammlung des Institutes für Molekulare Infektionsbiologie hervor (*E. coli* Isolate von HWI-Patientinnen, in Betreuung der Universitätsklinik Jena).

- **Kapitel: Phänotypische und genotypische Ergebnisse**

Unter der Überschrift „**Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate**“ findet sich eine Tabelle mit den absoluten und relativen Häufigkeiten der getesteten phänotypischen (grau unterlegt) und genotypischen Merkmale aller Isolate. Die Prozentzahlen geben jeweils den Anteil der positiv getesteten Merkmale in Relation zur Gesamtzahl aller Stuhlisolate, aller Urinisolate und aller Isolate insgesamt bei der betreffenden Patientin wieder. In Kapitel „IV.C. Auswertung patientenübergreifender Daten“ sind diese Werte für die Gesamtheit aller Patientinnen zusammengefaßt.

Der Abschnitt „**Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten**“ zeigt zuerst eine Tabelle, in der alle Klone der einzelnen Abnahmedaten in Unterteilung nach der Herkunft aus Stuhl oder Urin zusammen mit ihren wichtigen Pathogenitätsfaktoren dargestellt sind. Die Klone aus Stuhlisolaten sind grau unterlegt. Die letzte Spalte der Tabelle zeigt an, wieviele positive Pathogenitätsfaktoren der entsprechende Klon hat.

Als für diese Arbeit wichtige Pathogenitätsfaktoren werden betrachtet: *hly*, *pap*, *sfa/foc*, *fim*, K1, *kpsMT* II und III, *fyuA*, *iutA*, PAI und *ibeA*. Gencluster *pap* wurde *nur dann* als positiv gewertet, wenn die drei Gene *papA*, *papC* und *papEF* *gleichzeitig* positiv waren.

Im entsprechenden Abschnitt ist unterhalb der Tabelle vermerkt, welche Klone nur für eines oder zwei der drei der Definition zugrunde liegenden *pap*-Gene positiv waren.

In einer weiteren Tabelle werden nun die absoluten und relativen Häufigkeiten der getesteten Gene bzw. Gencluster innerhalb der definierten Klone aufgeschlüsselt, unterteilt nach Klonen aus Stuhlisolaten und Klonen aus Urinisolaten. Auch hierzu faßt eine Tabelle im letzten Abschnitt des Ergebnisteiles die Daten aller Patientinnen zusammen.

Unter der Überschrift „**Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone**“ werden die Stuhklone nach gleicher Art und Anzahl an positiven Pathogenitätsfaktoren zusammengefasst und weiter aufgegliedert nach den Kombinationen der vorkommenden Gene bzw. Gencluster. Das gleiche geschieht mit den Klonen aus Urinisolaten. Man kann aus diesen beiden Tabellen die beteiligten Gene bzw. Gencluster sowie die absoluten Häufigkeiten und die prozentualen Anteile der einzelnen Kombinationen ersehen. In Abschnitt „IV.C.“ zeigen zwei Darstellungen tabellarisch das Vorkommen aller Genkombinationen überhaupt, untergliedert nach ihrer Herkunft aus Stuhl oder Urin. Die Häufigkeiten von Klonen nach ihrer Art und Anzahl positiver Pathogenitätsfaktoren sowie die Häufigkeiten einzelner Genkombinationen sind dort auch grafisch dargestellt.

➤ **Kapitel: Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse**

Unter der Überschrift „**Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten**“ finden sich zwei Diagramme, die alle Ergebnisse der Rep-PCR und der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) im zeitlichen Verlauf über den gesamten Studienzeitraum hinweg darstellen. „Im gesamten Studienzeitraum“ meint hier, daß auch die Ergebnisse der beiden vorangegangenen Arbeiten von Brauchle (2002) und Maibaum (2003) mit einbezogen sind. Anfang bzw. Ende der einzelnen Arbeitszeiträume der Doktoranden sind im Diagramm durch eine Linie abgegrenzt. Die Pat. 22 (IH) wurde vorher nur von Frau Maibaum untersucht und die Pat. 29 (SJ) wurde für diese Arbeit neu aufgenommen.

Die Diagramme zeigen auf der Abszisse die Daten der Probenentnahmen (PE) im entsprechenden Buchstabencode und auf der Ordinate die den Mustern zugewiesenen Nummern. (Hinweis: Die römischen Zahlen der PFGE-Muster werden aus technischen Gründen in allen Diagrammen als arabische Zahlen wiedergegeben.) In der Darstellung werden die Ergebnisse nach ihrem Vorkommen in Stuhl oder Urin unterschieden. Da an einem Untersuchungsdatum mehrere Muster vorliegen können,

weil aus einer Stuhl- oder Urinprobe immer mehrere Isolate angefertigt wurden, werden die unterschiedlichen Muster entsprechend durchnummeriert (mit 1., 2., 3. usw.) und in der Abbildung farb- und größencodiert dargestellt. Muster aus Stuhlisolaten werden mit einer Raute dargestellt, Muster aus Urinisolaten mit einem Kreis.

Unter der nächsten Überschrift „**Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen**“ sind ebenfalls die Ergebnisse aus der Rep-PCR und der PFGE dargestellt, mit dem Unterschied, daß es sich nur um die Ergebnisse aus dem Beobachtungszeitraum dieser Arbeit handelt und daß sie nicht nach dem Abnahmedatum der Isolate, sondern nach dem chronologischen Auftreten der definierten Klone mit deren entsprechendem PE-Datum (im Buchstabencode) aufgetragen sind. Ob es sich um einen Stuhl- oder Urinklon handelt, geht im Diagramm aus der Legende hervor: Stuhklone sind mit einer Raute dargestellt, Urinklone mit einem Kreis. Die Nummer eines Klons kann dann zweimal zum selben Datum auftauchen, wenn der entsprechende Klon sowohl in Stuhl- als auch in Urinisolaten des betreffenden Datums vorkommt. Zusätzlich kann natürlich dieselbe Klonnummer zu unterschiedlichen Untersuchungsdaten erscheinen, wenn eben ein und derselbe Klon zu unterschiedlichen Abnahmedaten gefunden wurde, wie z.B. bei Pat. 2 (HF). In der Abbildung gibt es für manche Klone kein PFGE-Bandenmuster, weil für diese Klone kein Isolat zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt wurde.

Im Kapitel „**Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit**“ wird beschrieben, welche Isolate über welchen Zeitraum bzw. über welche Daten hinweg persistierten. Die dargelegten Fakten sind auch den Diagrammen über den Verlauf der PFGE-Ergebnisse der beiden vorangegangenen Kapitel zu entnehmen. Zur besseren Verdeutlichung sind die PFGE-Muster persistierender Stämme in den Abbildungen dieses Kapitels dargestellt. Es soll jetzt schon besonders auf dieses Kapitel bei Pat. 2 (HF) aufmerksam gemacht werden, denn bei dieser Patientin wurde ein singulärer Bandenshift, der im Pulsfeldgel unter verwandten Stämmen aufgetreten ist, gefunden und ist dort abgebildet und näher beschrieben.

„**Ähnlichkeiten von PFGE-Mustern innerhalb der PFGE-Ergebnisse des gesamten Studienzeitraumes**“ ist eine Zusammenfassung, welche PFGE-Bandenmuster einer Patientin sich ähnlich sehen, somit also untereinander potentiell verwandt sind. (Wenn es kein solches Kapitel gibt, wurden keine ähnlichen PFGE-Muster innerhalb der Stämme dieser Patientin gefunden.)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war ja das Screening auf verwandte Stämme, die sich auf DNA-Ebene verändert haben. Man erwartet von solchen Stämmen, daß sie ein

grundsätzlich gleiches Bandenmuster zeigen innerhalb dessen es in einer gewissen Bandenhöhe (gewisser kb-Bereich) zu wenigen unterschiedlichen Banden zwischen zwei Stämmen kommt, sog. Bandenshift(s) durch DNA-Umlagerung(en). Das Kapitel „**Detektion von DNA-Umlagerungen mit Hilfe der PFGE**“ bei Patientin 2 (HF) veranschaulicht detailliert einen solchen Bandenshift.

➤ **Kapitel: Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor**

Hier wird kurz der klinische Verlauf der betreffenden Patientin innerhalb des Zeitraumes dieser Arbeit beschrieben. Es geht vor allen Dingen um eine Unterscheidung zwischen aktiver („**A**“) Krankheitsphase oder inaktivem/stummem („**I**“) Intervall zum entsprechenden Untersuchungszeitpunkt. Außerdem sind hier, falls vorhanden, wichtige Zusatzinformationen genannt, wie z.B. eine durchgeführte Antibiotikatherapie oder eine Dauerprophylaxe mit L-Methionin (Acimethin®). Eine Grafik zeigt die Befunde der in Jena erhobenen speziellen nephrologischen Laborparameter (Fünfstück et al., 2003; Renz-Polster und Braun, 2001; Thomas, 2000) des untersuchten Urins zu jedem entsprechenden Abnahmedatum. Befundparameter sind:

- Vitale Leukozyten: Lebende weiße Blutkörperchen in %
- Vitale Epithelzellen: Lebende Oberflächenzellen des Harntraktes in %
- Antikörperbeladung der Bakterien (ACB, antibody count of bacteria): Anzahl der Bakterien, die mit Antikörpern beladen sind, in %
- Bakterielle Zytoadhärenz: Anzahl der Epithelzellen in % mit mehr als 20 Bakterien pro Epithelzelle

Die Labordaten für diese Diagramme sind unvollständig, was mehrere Gründe hat. Zum einen ist der Patientenpool zum Zeitraum dieser Arbeit meist klinisch inaktiv, was u.a. für eine suffiziente Therapie spricht, und zum anderen wurden zu manchen Routineuntersuchungen, zu denen sich die Patientinnen gesund fühlten, oft keine derartigen Laborparameter bestimmt. Desweiteren gab es Untersuchungsmaterial, welches sich als ungeeignet erwiesen hat, weil für diese spezifische Laboruntersuchung nicht genügend Zellen gewonnen werden konnten, z.B. durch Abnahme zu geringer Probenmengen oder durch Kontamination der Probe.

1. Patientin 1 (CB)

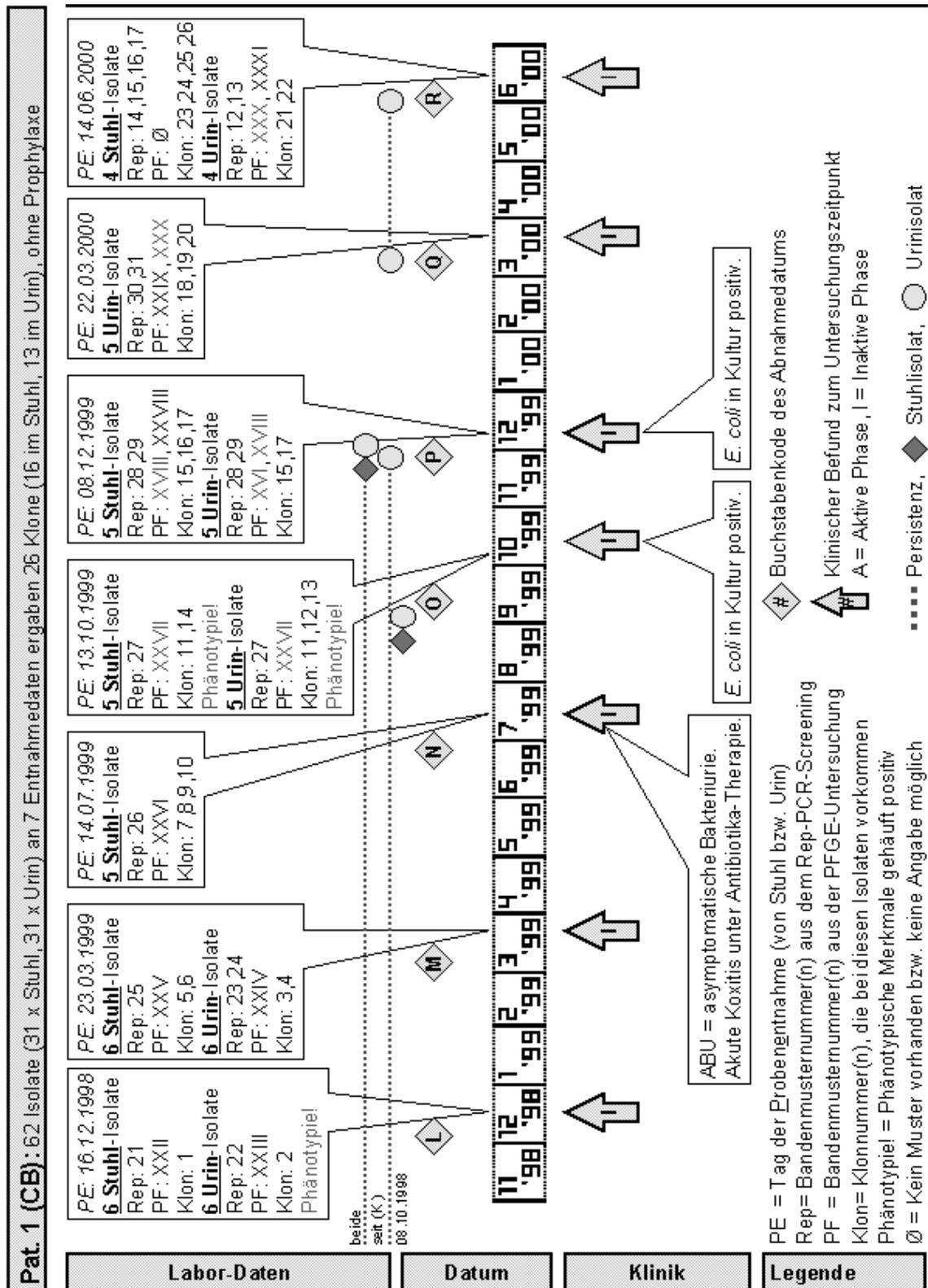


Abbildung IV.1: Verlauf der Untersuchungen bei Pat. 1 (CB)

1.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.4: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 1 (CB)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE n = 31		Positive Isolate in den Urin-PE n = 31		Positive Isolate insgesamt n = 62	
		[%]		[%]		[%]
Hly	n = 7	22,58	n = 12	38,71	n = 19	30,65
<i>hlyA</i>	n = 7	22,58	n = 11	35,48	n = 18	29,03
Pap/Prs	n = 14	45,16	n = 18	58,06	n = 32	51,61
<i>papA</i>	n = 12	38,71	n = 12	38,71	n = 24	38,71
<i>papC</i>	n = 13	41,94	n = 12	38,71	n = 25	40,32
<i>papEF</i>	n = 14	45,16	n = 12	38,71	n = 26	41,94
<i>papG</i> Allel I	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>papG</i> Allel III	n = 6	19,35	n = 11	35,48	n = 17	27,42
Sfa	n = 1	3,23	n = 5	16,13	n = 6	9,68
<i>sfa/focDE</i>	n = 25	80,65	n = 19	61,29	n = 44	70,97
Fim	n = 27	87,10	n = 28	90,32	n = 55	88,71
<i>fimH</i>	n = 27	87,10	n = 31	100,00	n = 58	93,55
K1	n = 11	35,48	n = 21	67,74	n = 32	51,61
<i>kpsMT</i> II	n = 27	87,10	n = 23	74,19	n = 50	80,65
<i>kpsMT</i> III	n = 5	16,13	n = 7	22,58	n = 12	19,35
<i>fyuA</i>	n = 28	90,32	n = 23	74,19	n = 51	82,26
<i>iutA</i>	n = 22	70,97	n = 23	74,19	n = 45	72,58
PAI	n = 24	77,42	n = 18	58,06	n = 42	67,74
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 21	67,74	n = 11	35,48	n = 32	51,61
<i>bmaE</i>	n = 11	35,48	n = 11	35,48	n = 22	35,48
<i>rfc</i>	n = 0	0,00	n = 6	19,35	n = 6	9,68

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.5: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 1 (CB)

Klone (Stuhl: n=16) (Urin: n=13)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
1KL1	L	S			+	+	+	+		+	+	+	+	8
1KL2	L	U	+	+	+	+		+		+	+	+		8
1KL3	M	U				+	+		+		+			4
1KL4	M	U				+	+		+		+			4
1KL5	M	S			+	+		+		+		+	+	6
1KL6	M	S			+	+		+		+	+	+	+	7
1KL7	N	S	+	+	+	+		+	+	+	+	+		9
1KL8	N	S		+	+	+		+	+	+	+	+		8
1KL9 ^a	N	S			+	+		+	+	+	+			6
1KL10 ^b	N	S			+	+		+		+	+			5
1KL11	O	U	+	+	+	+		+		+	+	+		8
1KL11	O	S	+	+	+	+		+		+	+	+		8
1KL12	O	U	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	10

IV. Ergebnisse

1KL13	O	U	+	+	+	+	+	+		+	+	+		9
1KL14	O	S	+	+	+	+		+		+	+	+	+	9
1KL15	P	U		+		+	+	+		+	+	+		7
1KL15	P	S		+		+	+	+		+	+	+		7
1KL16	P	S		+		+	+	+		+	+	+	+	8
1KL17	P	U				+	+	+		+	+		+	6
1KL17	P	S				+	+	+		+	+		+	6
1KL18	Q	U			+	+	+		+		+			5
1KL19	Q	U			+	+	+	+		+		+	+	7
1KL20	Q	U			+	+	+	+		+				5
1KL21	R	U				+								1
1KL22	R	U			+	+	+	+		+		+	+	7
1KL23 ^a	R	S								+				1
1KL24	R	S			+								+	2
1KL25	R	S			+				+					2
1KL26	R	S			+								+	2

^a *papEF*(+) ^b *papC*(+)

Tabelle IV.6: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 1 (CB)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 16	[%]	n = 13	[%]
<i>hly</i>	n = 3	18,75	n = 4	30,77
<i>pap</i>	n = 6	37,50	n = 5	38,46
<i>sfa/foc</i>	n = 12	75,00	n = 8	61,54
<i>fim</i>	n = 12	75,00	n = 13	100,00
K1	n = 4	25,00	n = 10	76,92
<i>kpsMT II</i>	n = 12	75,00	n = 9	69,23
<i>kpsMT III</i>	n = 4	25,00	n = 3	23,08
<i>fyuA</i>	n = 13	81,25	n = 9	69,23
<i>iutA</i>	n = 11	68,75	n = 9	69,23
PAI	n = 9	56,25	n = 7	53,85
<i>ibeA</i>	n = 8	50,00	n = 4	30,77

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.7: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhlklonen von Pat. 1 (CB)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=16)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
1	1 x	6,25	<i>fyuA</i>
2	3 x	18,75	<i>sfa/foc + ibeA</i> (2 x) <i>sfa/foc + kpsMT III</i>
5	1 x	6,25	<i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA</i>
6	3 x	18,75	<i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i> <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA</i> <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>
7	2 x	12,50	<i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i> <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>
8	4 x	25,00	<i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i> <i>pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA + PAI</i> <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i> <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>
9	2 x	12,50	<i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA + PAI</i> <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>

Tabelle IV.8: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 1 (CB)

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=13)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
1	1 x	7,69	<i>fim</i>
4	2 x	15,38	<i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i> (2 x)
5	2 x	15,38	<i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i> <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i>
6	1 x	7,69	<i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i>
7	3 x	23,08	<i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (2 x)
8	2 x	15,38	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI (2 x)
9	1 x	7,69	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI
10	1 x	7,69	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i>

1.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

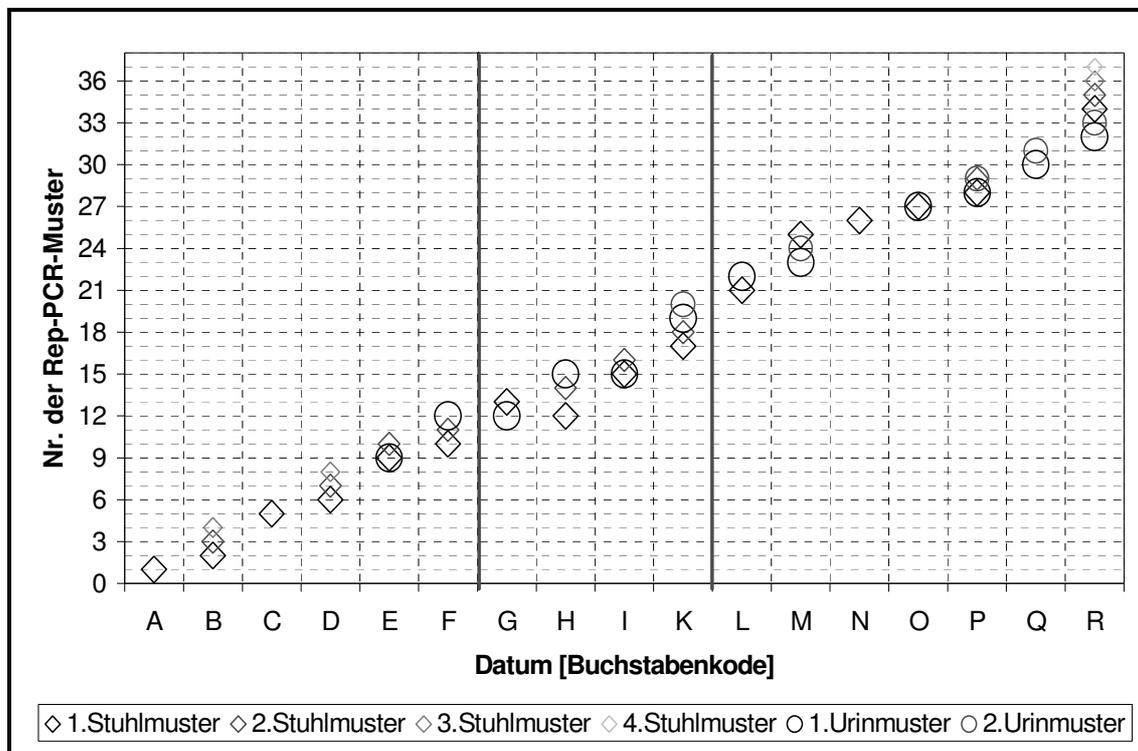


Abbildung IV.2: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 1 (CB)

Man kann aus der chronologischen Darstellung der Bandenmuster aus der Rep-PCR ersehen, wenn ein Muster zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftaucht. Außerdem ist die Herkunft des Isolates bzw. der Isolatengruppe, die ein Bandenmuster bildet, aus Stuhl oder Urin zu erkennen. Beispielsweise wird das Rep-PCR-Bandenmuster Nr. 12 zu den Abnahmedaten F, G und H gefunden, wobei das zugehörige Isolat zum Zeitpunkt F und G aus Urin stammte, während es zum Datum H aus Stuhl isoliert wurde. Die Proben zum Datum P ergaben zwei unterschiedliche Bandenmuster, die jeweils in Stuhl- und Urinproben gefunden wurden, während zum Zeitpunkt R zwei verschiedene Urin- und vier verschiedene Stuhlbandenmuster auftraten, die zu keinem anderen Zeitpunkt eine Entsprechung fanden.

IV. Ergebnisse

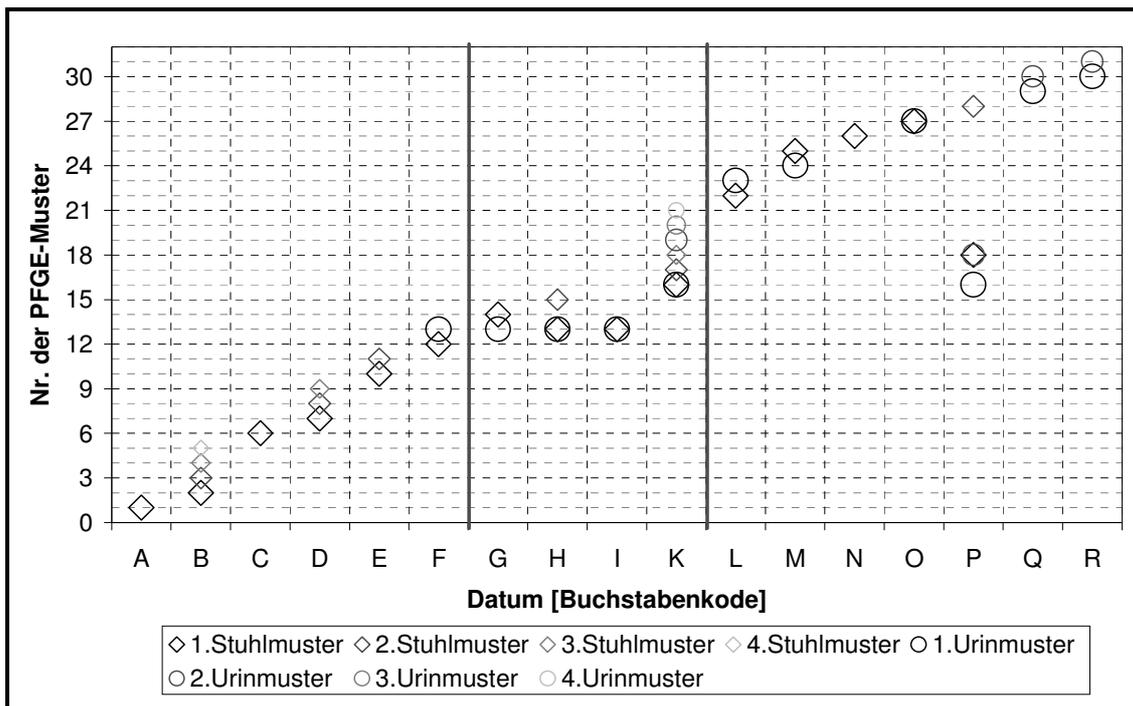


Abbildung IV.3: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 1 (CB)

Die chronologische Ordnung der unterschiedlichen PFGE-Bandenmuster zeigt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit dieser Methode untersuchten Isolate zueinander. Man erkennt persistierende Stämme und kann sie nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe unterscheiden. Zum Beispiel persistieren die Stämme mit dem PFGE-Muster XVIII (18) im Zeitraum K bis P und können zum Zeitpunkt K aus Stuhl isoliert werden, während sie zum Zeitpunkt P sowohl in der Stuhl- wie auch in der Urinprobe zu finden sind.

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

Zur Abbildung IV.4:

Das Diagramm zeigt die chronologische Abfolge der definierten Klone im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Manche Klone kommen sowohl in Stuhl- wie auch in Urinisolaten vor und sind deshalb auf der Abszisse doppelt vertreten. Man erkennt auf einen Blick, wenn mehrere Klone gemeinsame PFGE-Muster zeigen. Bei Klonen ohne PFGE-Bandenmuster wurde kein Isolat zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt. Das PFGE-Muster des Isolates 1P1U (^a1KL15) stimmt mit den Mustern von 1K1 und 1K2U (gefunden bei Maibaum, 2003) überein. Gleiches gilt analog für die Isolate 1P2U und 1P4 (^b1KL17) mit den Isolaten 1K5 und 1K6 bei Maibaum, 2003. Die Isolate 1Q2U (^c1KL19) und 1R2 (^c1KL22) zeigen beide dasselbe PFGE-Bandenmuster Nr. XXX.

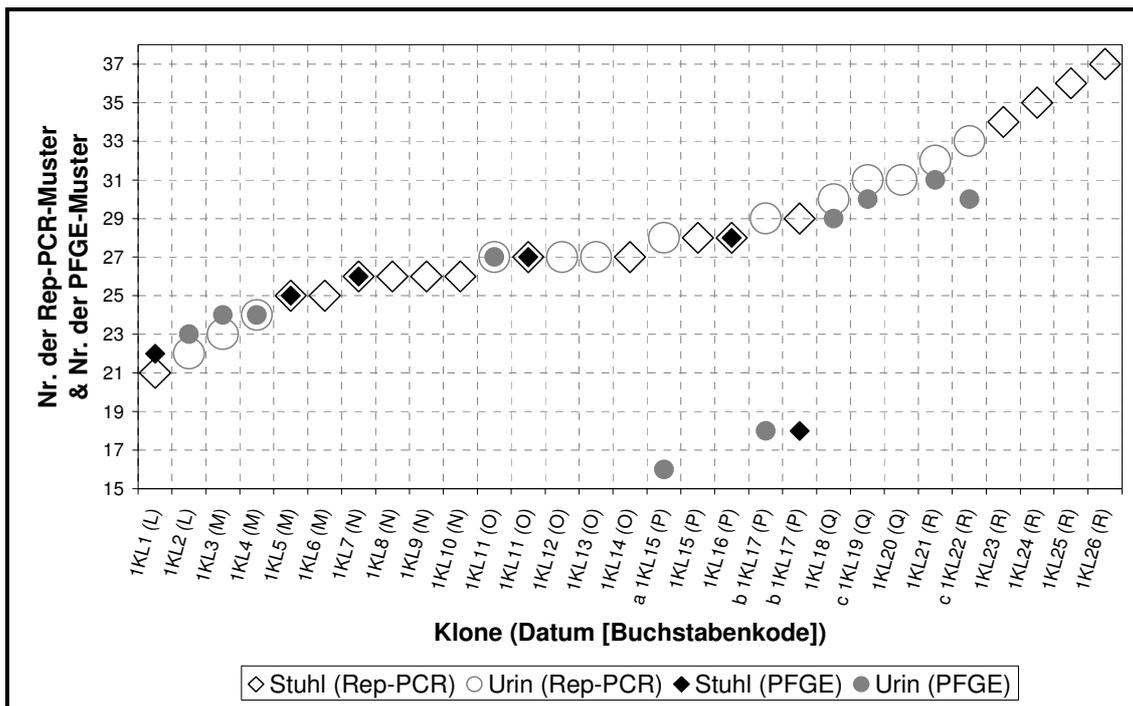


Abbildung IV.4: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 1 (CB)

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Die PFGE-Muster von Isolat **1M1U** und **1M2U** sind beide identisch. Die beiden Varianten haben die Nummer XXIV (Abb. IV.5, Spur 2 und 3). Beide Isolate, obwohl vom gleichen Untersuchungsdatum am 23.03.1999, zeigen in der MP-PCR unterschiedliche Ergebnisse und gehören daher verschiedenen Klonen an (1KL3 und 1KL4). Am 13.10.1999 wurde das Stuhlisolat **1O1** und das Urinisolat **1O1U** abgenommen. Beide Isolate weisen dasselbe PFGE-Muster (XXVII) auf, so daß man vermuten darf, daß der aus Urin isolierte Keim aus dem Darmtrakt stammt. Die Abbildung IV.5 (Gespuren 4 und 5) zeigt die PFGE-Muster der beiden Stämme, die beide demselben Klon angehören, 1KL11.

Zum 08.12.1999 konnte dasselbe Phänomen nochmals nachgewiesen werden. Wieder wurden ein Urin- und ein Stuhlisolat, die beide das gleiche PFGE-Muster haben (XVIII), zum selben Abnahmezeitpunkt detektiert. Es handelt sich um die Isolate **1P2U** und **1P4**, beide Klon Nummer 17 (Abb. IV.5, Spur 6 und 7).

In der Arbeit von Maibaum (2003) wurde bereits exakt jenes PFGE-Muster (Nummer XVIII) gefunden und zwar bei den Stuhlisolaten **1K5** und **1K6**, für die die Proben am 08.10.1998 entnommen wurden. Abbildung IV.6 zeigt in Gel 2 die Muster der Isolate **1K5** und **1P2U** nebeneinander. Zwischen dem Abnahmedatum des einen und dem des anderen Isolates liegt ein Zeitraum von 14 Monaten.

IV. Ergebnisse

Die letzten beiden Spuren (8 und 9) des Gels in der Abbildung IV.5 zeigen die PFGE-Muster des Urinisolates **1Q2U** (1KL19), abgenommen am 22.03.2000, und des Urinisolates **1R2U** (1KL22), abgenommen am 14.06.2000. Die PFGE-Muster stimmen überein und haben die Nummer XXX. Hier persistierten also zwei Varianten aus Urinisolaten mit dem PFGE-Muster XXX über einen Zeitraum von knapp drei Monaten.

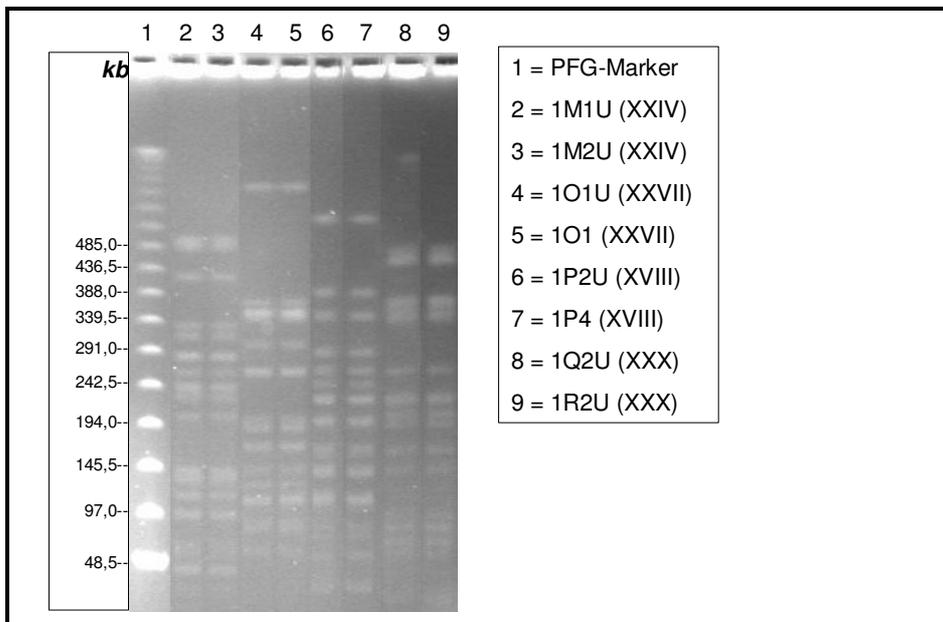


Abbildung IV.5: *XbaI*-Restriktionsmuster persistierender Stämme bei Pat. 1 (CB)

Die Zusammenstellung der PF-Elektrophoresemuster zeigt die *XbaI*-Restriktionsmuster von vier Stämmen, die bei dieser Patientin jeweils untereinander identisch sind.

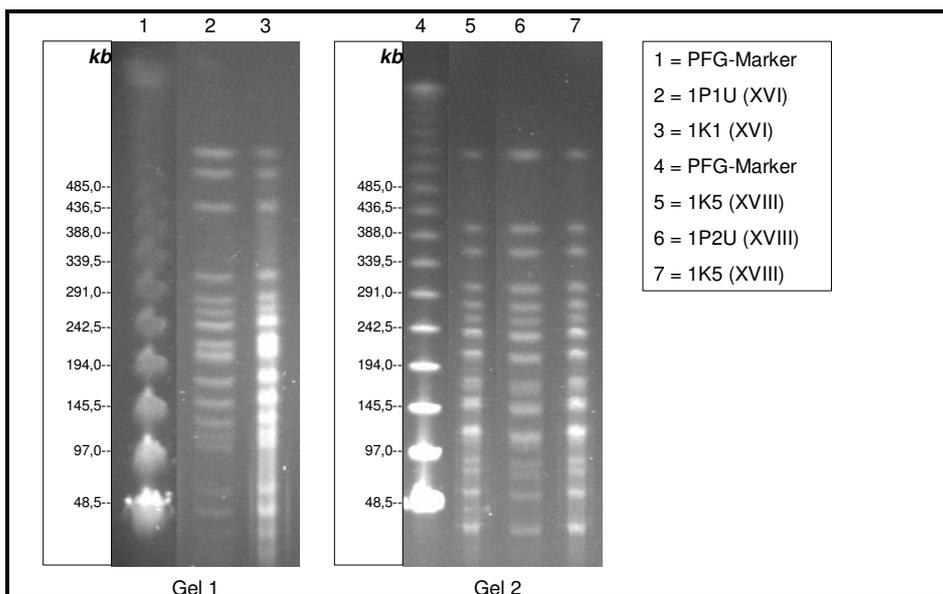


Abbildung IV.6: *XbaI*-Restriktionsmuster persistierender Stämme bei Pat. 1 (CB)

Zum Untersuchungstermin am 08.12.1999 wurde für das Urinisolat **1P1U** (Klon 1KL15) das PFGE-Muster XVI nachgewiesen, welches erstmalig am 08.10.1998 in der Arbeit von Maibaum (2003) aufgetaucht ist, und dort von einem Stuhl- (**1K1**) und einem Urinstamm (**1K2U**) gezeigt wurde. Die Stämme unterscheiden sich allerdings hinsichtlich des MP-Profiles und des Rep-PCR-Musters, es sind also Varianten. Wie vorher für die Isolate **1P2U** und **1P4** sowie ihre korrespondierenden Isolate in Frau Maibaums Arbeit **1K5** und **1K6**, liegt auch hier eine Persistenz über 14 Monate vor.

➤ Fazit:

Es haben also zwei unterschiedliche *E. coli* Stämme mit jeweils gleichem PFGE-Muster je 14 Monate lang persistiert, die beide sowohl in Stuhl- als auch in Urinproben präsent waren. Außerdem hat ein Urinstamm knapp drei Monate überdauert.

1.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Die Patientin 1 befand sich immer in einem klinisch inaktiven Stadium. Zum Untersuchungszeitpunkt N litt die Patientin allerdings unter einer akuten Koxitis (Entzündung des Hüftgelenkes), weswegen sie mit Antibiotika behandelt werden mußte. Es wurde zu diesem Datum eine asymptomatische Bakteriurie (= ABU) festgestellt. Zum Termin O und P wurden in den Urinkulturen *E. coli* Bakterien nachgewiesen, ohne daß sich die Patientin beeinträchtigt fühlte. Eine Acimethin®-Dauerprophylaxe bestand *nicht*. Die folgende Grafik zeigt die Labordaten der Pat. 1 (CB) für den Zeitraum dieser Arbeit.

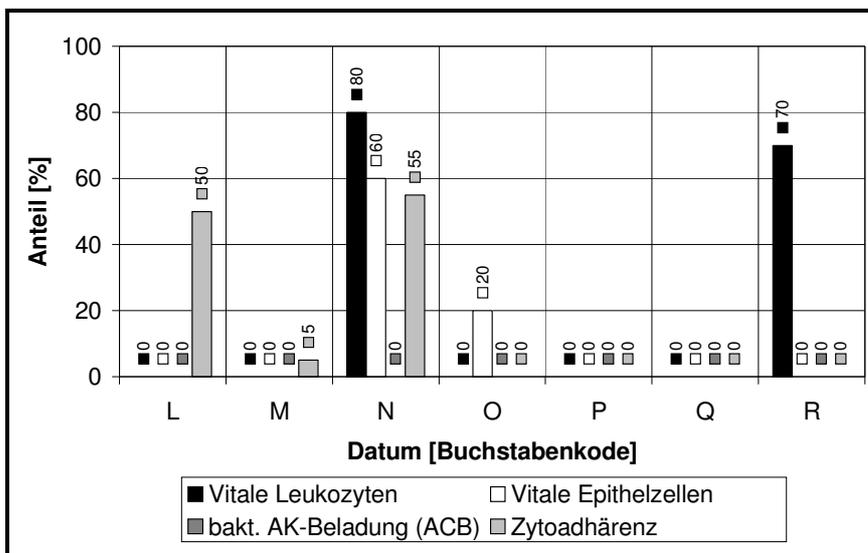


Abbildung IV.7: Nephrologisches Labor der Pat. 1 (CB)

Die beschriebene asymptomatische Bakteriurie zeigt sich zum Datum N deutlich in den erhobenen Parametern. Die erhöhten Einzelwerte zum Zeitpunkt L sowie zum Zeitpunkt R können nicht ausreichend mit der Klinik der Patientin korreliert werden.

2. Patientin 2 (HF)

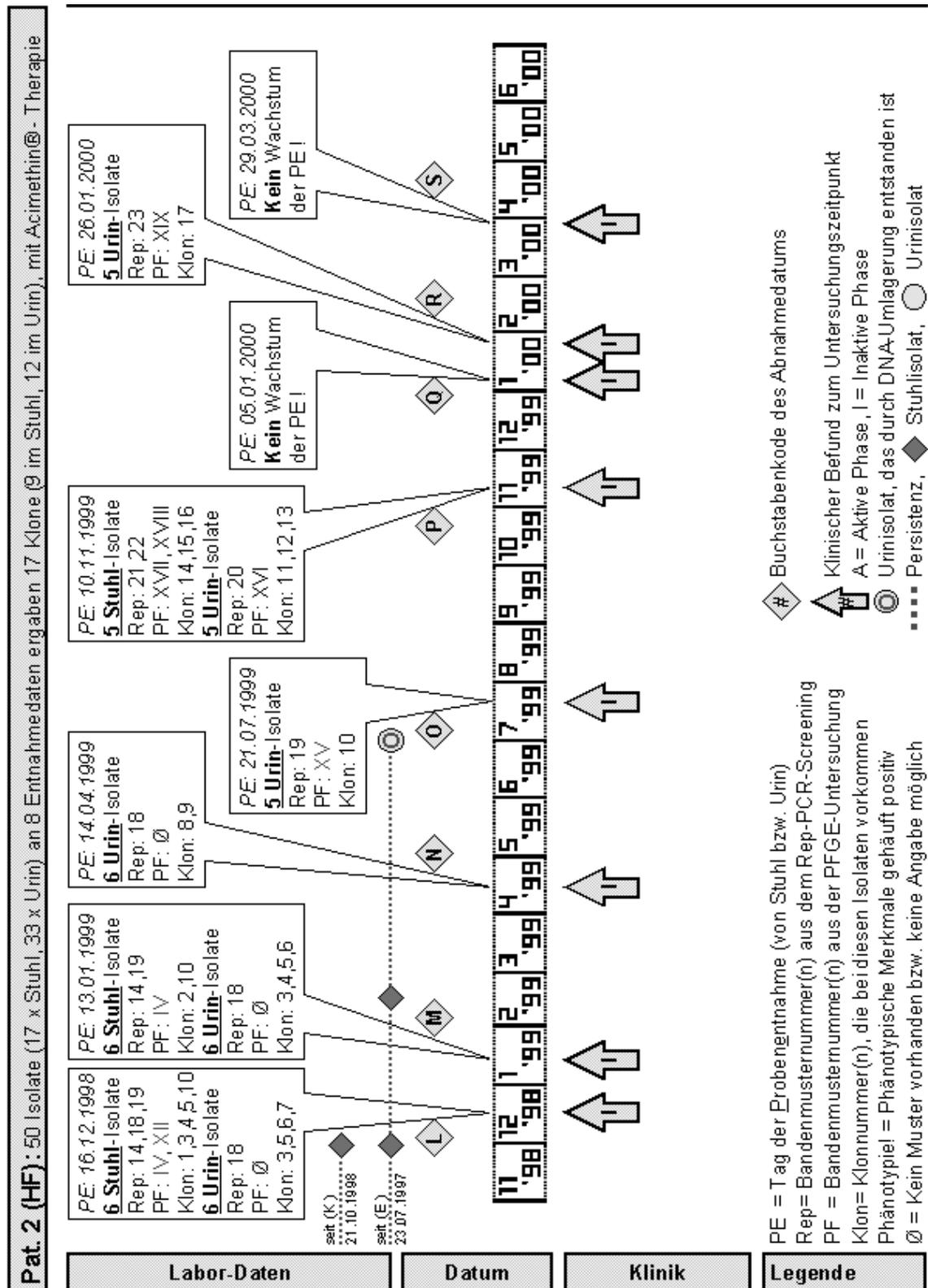


Abbildung IV.8: Verlauf der Untersuchungen bei Pat. 2 (HF)

2.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.9: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 2 (HF)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE		Positive Isolate in den Urin-PE		Positive Isolate insgesamt	
	n = 17	[%]	n = 33	[%]	n = 50	[%]
Hly	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>hlyA</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
Pap/Prs	n = 9	52,94	n = 1	3,03	n = 10	20,00
<i>papA</i>	n = 2	11,76	n = 8	24,24	n = 10	20,00
<i>papC</i>	n = 3	17,65	n = 0	0,00	n = 3	6,00
<i>papEF</i>	n = 6	35,29	n = 21	63,64	n = 27	54,00
<i>papG</i> Allel I	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>papG</i> Allel III	n = 0	0,00	n = 5	15,15	n = 5	10,00
Sfa	n = 6	35,29	n = 4	12,12	n = 10	20,00
<i>sfa/focDE</i>	n = 8	47,06	n = 7	21,21	n = 15	30,00
Fim	n = 16	94,12	n = 25	75,76	n = 41	82,00
<i>fimH</i>	n = 17	100,00	n = 25	75,76	n = 42	84,00
K1	n = 9	52,94	n = 6	18,18	n = 15	30,00
<i>kpsMT II</i>	n = 10	58,82	n = 10	30,30	n = 20	40,00
<i>kpsMT III</i>	n = 6	35,29	n = 21	63,64	n = 27	54,00
<i>fyuA</i>	n = 9	52,94	n = 10	30,30	n = 19	38,00
<i>iutA</i>	n = 11	64,71	n = 16	48,48	n = 27	54,00
PAI	n = 10	58,82	n = 5	15,15	n = 15	30,00
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 6	35,29	n = 5	15,15	n = 11	22,00
<i>bmaE</i>	n = 0	0,00	n = 6	18,18	n = 6	12,00
<i>rfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.10: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 2 (HF)

Klone (Stuhl: n=9) (Urin: n=12)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT II</i>	<i>kpsMT III</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
2KL1 ^a	L	S				+			+					2
2KL2 ^a	M	S				+		+	+		+	+		5
2KL3 ^a	L	S				+			+		+			3
2KL3 ^a	L	U				+			+		+			3
2KL3 ^a	M	U				+			+		+			3
2KL4 ^a	L	S				+			+					2
2KL4 ^a	M	U				+			+					2
2KL5 ^{ab}	L	S				+			+					2
2KL5 ^{ab}	L	U				+			+					2
2KL5 ^{ab}	M	U				+			+					2
2KL6 ^{ab}	L	U				+			+		+			3
2KL6 ^{ab}	M	U				+			+		+			3
2KL7	L	U				+					+			2

IV. Ergebnisse

2KL8 ^a	N	U					+			+						2
2KL9	N	U					+									1
2KL10	L	S				+	+	+	+		+	+	+	+		8
2KL10	M	S				+	+	+	+		+	+	+	+		8
2KL10	O	U				+	+	+	+		+	+	+	+		8
2KL11	P	U						+	+							2
2KL12	P	U											+			1
2KL13	P	U				+	+						+			3
2KL14	P	S				+	+									2
2KL15 ^c	P	S					+	+	+		+	+	+			6
2KL16 ^{bc}	P	S					+	+	+		+	+	+			6
2KL17 ^a	R	U							+	+	+					3

^a *papEF*(+) ^b *papA*(+) ^c *papC*(+)

Tabelle IV.11: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 2 (HF)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 9	[%]	n = 12	[%]
<i>hly</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>pap</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>sfa/foc</i>	n = 2	22,22	n = 2	16,67
<i>fim</i>	n = 9	100,00	n = 9	75,00
K1	n = 3	33,33	n = 2	16,67
<i>kpsMT II</i>	n = 4	44,44	n = 3	25,00
<i>kpsMT III</i>	n = 5	55,56	n = 6	50,00
<i>fyuA</i>	n = 3	33,33	n = 2	16,67
<i>iutA</i>	n = 5	55,56	n = 6	50,00
PAI	n = 4	44,44	n = 1	8,33
<i>ibeA</i>	n = 1	11,11	n = 1	8,33

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.12: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhlklonen von Pat. 2 (HF)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=9)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
2	4 x	44,44	<i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> (3 x) <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i>
3	1 x	11,11	<i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i>
5	1 x	11,11	<i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i> + PAI
6	2 x	22,22	<i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI (2 x)
8	1 x	11,11	<i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i>

Tabelle IV.13: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 2 (HF)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=12)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
1	2 x	16,67	<i>fim</i> <i>iutA</i>
2	5 x	41,67	<i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> (3 x) <i>fim</i> + <i>iutA</i> K1 + <i>kpsMT II</i>
3	4 x	33,33	<i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i> (2 x) <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>iutA</i> <i>kpsMT II</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>fyuA</i>
8	1 x	8,33	<i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i>

2.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

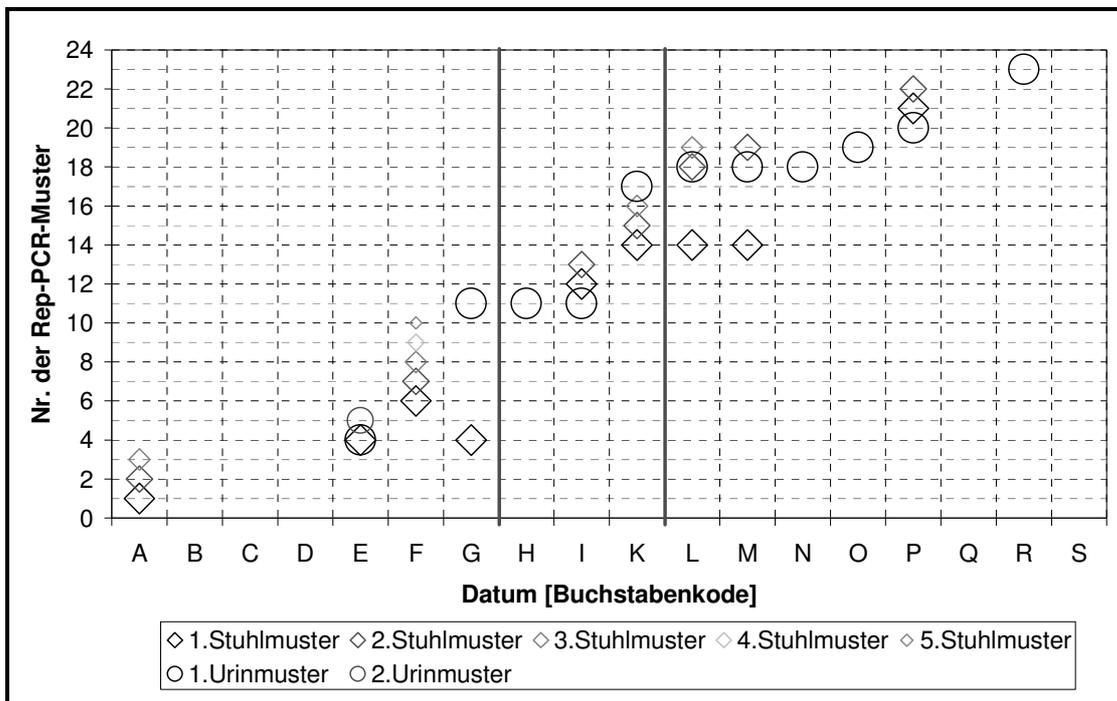


Abbildung IV.9: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 2 (HF)

Durch die chronologische Darstellung der Rep-PCR-Bandenmuster ist ersichtlich, wenn ein und dasselbe Muster mehrfach auftaucht. Außerdem ist eine Unterscheidung nach Herkunft des Isolates bzw. der Isolatengruppe, nämlich aus Stuhl oder Urin, möglich. Wenn zu einem Abnahmedatum keine Bandenmuster existieren, liegt das daran, daß keine Isolate aus den Proben hergestellt werden konnten. Aus dem Diagramm kann man zu den Daten L bis N beispielsweise das Bandenmuster 18 ablesen, das zum Zeitpunkt L sowohl in Proben aus Stuhl als auch aus Urin auftaucht und noch weitere zwei Untersuchungstermine lang in Urinisolaten zu finden ist.

Zur Abbildung IV.10:

Die chronologische Ordnung der Bandenmuster aus der Untersuchung mit PFGE zeigt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit dieser Methode untersuchten Isolate zueinander. Persistierende Stämme sind schnell erkennbar und man kann sie nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe unterscheiden. In diesem Diagramm sieht man, daß Stämme mit dem Muster IV von Zeitpunkt E (in Urin- und Stuhlprobe) bis zum Zeitpunkt M (in Stuhlprobe) nachweisbar sind. Ansonsten persistieren bei dieser Patientin nur noch zwei weitere Stämme, erkennbar an den PFGE-Mustern XI (I bis K) und XII (K bis L). Wenn zu bestimmten Untersuchungszeitpunkten keine Einträge zu sehen sind, liegt das analog zum Verlauf der Rep-PCR-Muster (s.o.) daran, daß keine Isolate angezüchtet werden konnten, oder aber daran, daß kein Isolat dieses Zeitpunktes zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt wurde.

Zur Abbildung IV.11:

Die Grafik veranschaulicht die chronologische Reihenfolge der definierten Klone mit ihren zugehörigen Rep-PCR- und PFGE-Bandenmustern im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Manche Klone sind auf der Abszisse doppelt aufgetragen, weil sie sowohl in Stuhl- wie auch in Urinisolaten vorkommen. Wenn ein Klon kein PFGE-Muster zeigt, so wurde kein Isolat dieses Klones zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt. Die Isolate 2L4 (^a2KL10) und 2M1 (^a2KL10) aus dieser Arbeit sowie die Isolate 2E1U, 2E2U, 2G1 und 2G6 aus der Arbeit von Brauchle (2002) zeigen alle das PFGE-Muster IV. Das Isolat 2O1U (^b2KL10) zeigt im PFGE-

IV. Ergebnisse

Muster einen einzigen Bandenshift und ist ansonsten mit allen vorher genannten Isolaten identisch. Es hat die PFGE-Muster-Nummer XV (siehe folgende Abschnitte).

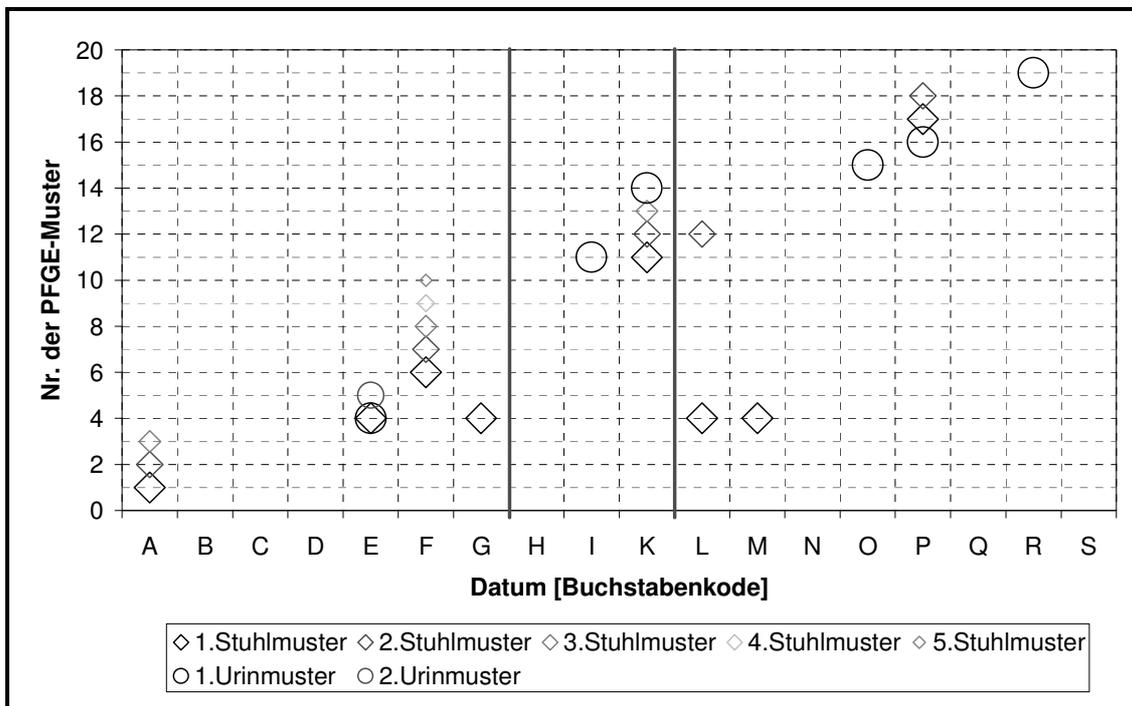


Abbildung IV.10: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 2 (HF)

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

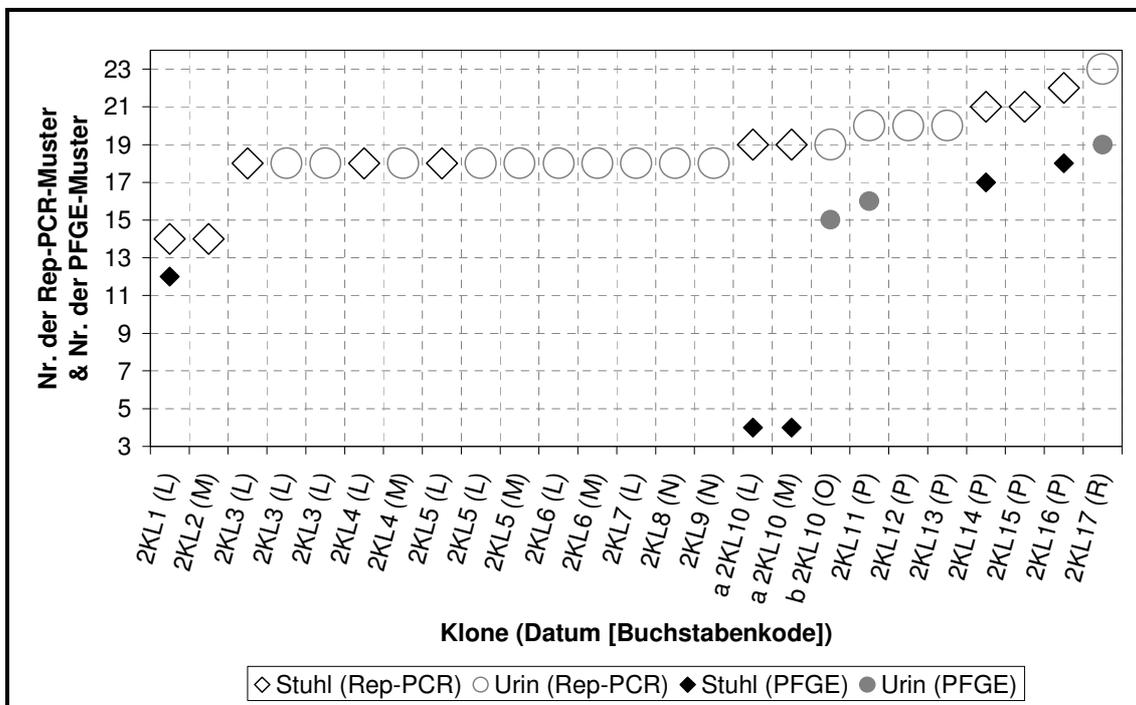


Abbildung IV.11: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 2 (HF)

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Der Untersuchungstermin vom 16.12.1998 erbrachte u.a. das Stuhlisolat **2L4** (Klon 2KL10). Zur Wiedervorstellung der Patientin am 13.01.1999 wurde aus der Stuhlprobe das Isolat **2M1** (ebenfalls 2KL10) gewonnen. Beide Isolate zeigen das PFGE-Muster mit der Nummer IV. Sie sind in Abbildung IV.12 in Spalte 4 und 5 des Pulsfeldgeles zu sehen. Es handelt sich also bei diesem Stamm um eine bewiesene Persistenz im Darmtrakt für ca. vier Wochen. Das PFGE-Muster beider Stuhlisolate (**2L4** und **2M1**) wurde jedoch schon sehr viel früher in der Arbeit von Brauchle (2002) zum ersten Mal nachgewiesen. In jener Arbeit trat das PFGE-Muster IV zu zwei unterschiedlichen Abnahmedaten in Urin- und Stuhlisolaten auf. Das Stuhlisolat **2E1** und die Urinisolate **2E1U** und **2E2U** vom 23.07.1997 sowie die Stuhlisolate **2G1** und **2G6** vom 07.01.1998 gehören zu einem Klon (2KL10). Das Muster der DNA-Auftrennung des Isolates **2E1U** (Spuren 2 und 3) findet sich in der Abbildung IV.12 neben den Mustern der beiden Stämme **2L4** und **2M1**, mit denen es exakt gleich ist. Dies bedeutet Persistenz eines Stammes für über 17 Monate.

Es wurde noch ein weiterer persistierender Stamm gefunden, allerdings nur innerhalb von Stuhlisolaten. Das Isolat **2K1**, gefunden bei Maibaum (2003) am 21.10.1998 sowie das Isolat **2L2** vom 16.12.1998 wiesen dieselben PFGE-Muster auf (Abb. IV.12, Spur 8 und 9). Dieser Stuhlstamm wurde also für knapp sieben Wochen nachgewiesen.

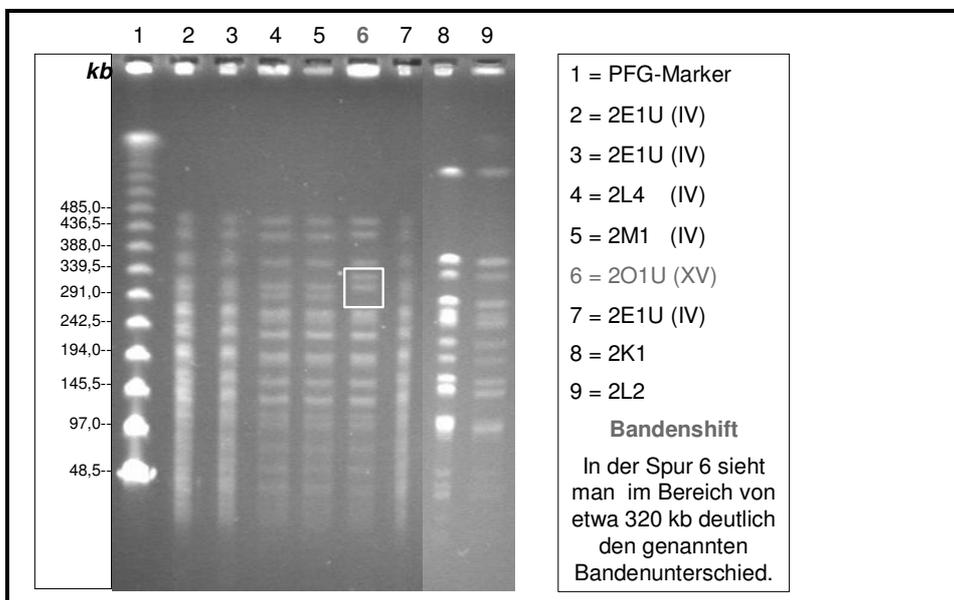


Abbildung IV.12: *Xba*I-Restriktionsmuster persistierender Stämme bei Pat. 2 (HF)

Diese Zusammenstellung der Bandenmuster zeigt, welche Stämme untereinander gleich sind. In Spur 6 erkennt man einen Stamm, der sich von den vorhergehenden nur im Bereich etwa zwischen 290 und 340 kb abhebt.

IV. Ergebnisse

Detektion von DNA-Umlagerungen mit Hilfe der PFGE

Wie bereits angedeutet, wurde bei Pat. 2 (HF) eine Besonderheit gefunden. Zum Abnahmedatum am 21.07.1999 wurde das Isolat **2O1U** aus Urin isoliert. Wie aus dem *Xba*I-Restriktionsmuster in Abbildung IV.12 (Markierung) ersichtlich, handelt es sich hierbei um einen Stamm, der mit den anderen in diesem Gellauf aufgetragenen Stämmen, die zuvor schon beschrieben wurden, verwandt ist. In der Spur 6 des Geles erkennt man, daß sich dieser Stamm von den anderen nur durch eine einzige Bandenverschiebung (Bandenshift) unterscheidet.

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwandten Isolate noch einmal mit ihren phänotypischen und genotypischen Merkmalen separat aufgelistet. Man erkennt die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse. Es sei darauf hingewiesen, daß der Test auf *iutA* beim Isolat **2E1U** negativ war, während der Gentest bei den übrigen Stämmen positiv ausfiel. Es handelt sich bei **2E1U** also definitionsgemäß um eine genotypische Variante. Die phänotypischen Tests auf Pap/Prs sind bei den Stuhlisolaten **2L4** und **2M1** falsch positiv.

Tabelle IV.14: Isolate von Pat. 2 (HF) mit einer Persistenzdauer von ungefähr zwei Jahren

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE	Hly	<i>hlyA</i>	Pap/Prs	<i>papA</i>	<i>papC</i>	<i>papEF</i>	<i>papG</i> Allel I	<i>papG</i> Allel III	<i>Sfa</i>	<i>sfa/focDE</i>	<i>Fim</i>	<i>fimH</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>nfaE</i>	<i>ibeA</i>	<i>bmaE</i>	<i>rfa</i>
23.07.97	177	2E1U	4	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
16.12.98	1153	2L4	20	IV	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
13.01.99	1199	2M1	20	IV	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
21.07.99	1360	2O1U	20	XV	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-

Erwähnt sei an dieser Stelle außerdem noch, daß alle drei Doktoranden Pulsfeldblöckchen erhielten, die in der Pulsfeldgelelektrophorese nicht oder nur als Schmierfilm erschienen und auch bei veränderten Bedingungen keine Banden lieferten. Für die Isolate, bei denen so etwas vorkam, wurde in den Ergebnistabellen in der Spalte für die PFGE-Muster-Nummern „n.a.“ (nicht auswertbar) eingetragen. Bei dieser Patientin waren folgende Isolate nicht verwertbar: 2G1U, 2H1U, 2H5U, 2I1U, 2I4U, 2I6U, 2K1U, 2L1, 2L1U, 2M1U und zuletzt 2N1U. Bei dieser unerwartet hohen Anzahl an nicht verwertbaren Bandenmustern, fällt besonders auf, daß es sich fast ausschließlich um Urinstämme handelt (1:10).

➤ Fazit:

Es wurde ein Stamm gefunden, der eine Persistenz über einen Zeitraum von zwei Jahren sowohl im Stuhl als auch im Urin der Patientin 2 zeigt und außerdem in genomisch unterschiedlicher Variation (evtl. DNA-Umlagerung) vorzuliegen scheint.

2.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Patientin 2 fühlte sich zu allen Untersuchungen gesund. Sie zeigte zu keinem der Kontrolltermine eine akute Symptomatik. Soweit abgenommen, waren alle Urinkulturen negativ. Die Patientin 2 stand für die gesamte Dauer dieses Studienzeitraumes unter einer Dauertherapie mit Acimethin® (= L-Methionin zur Harnansäuerung). Im folgenden sind die Werte des Nephrologischen Labors für die Patientin über den Untersuchungszeitraum hinweg dargestellt.

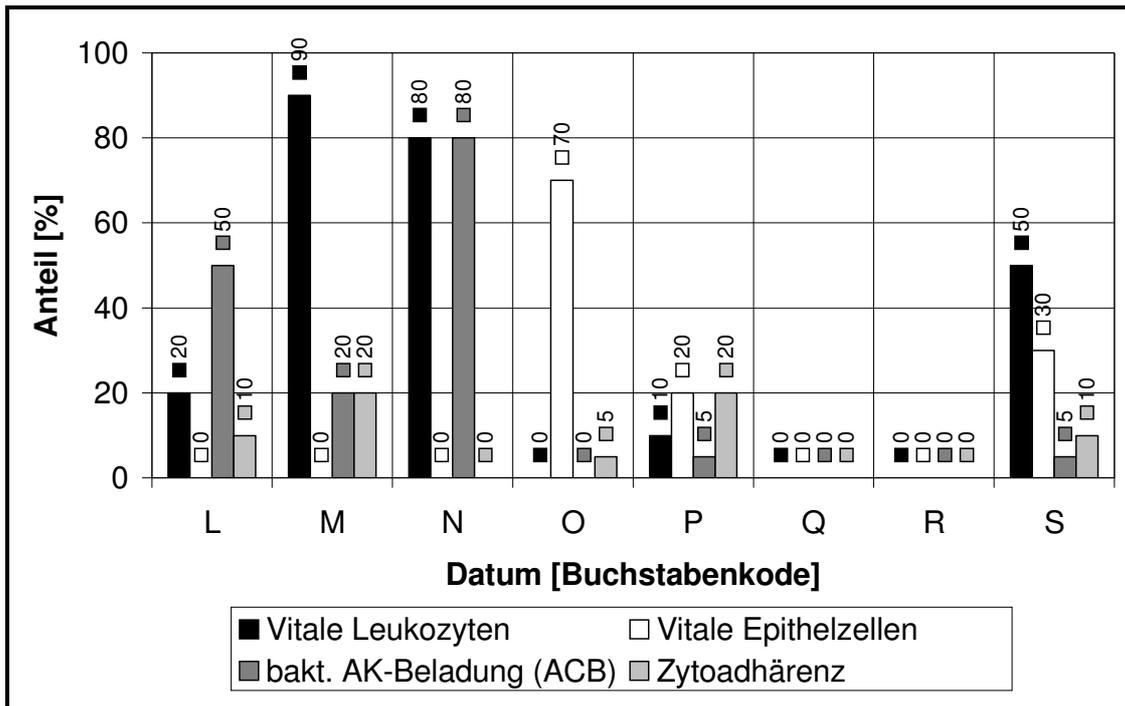


Abbildung IV.13: Nephrologisches Labor der Pat. 2 (HF)

Die erhöhten Laborparameter in der Grafik korrelieren nicht mit dem Allgemeinzustand der Patientin. Sie scheinen vielmehr Ausdruck der Chronizität der Pyelonephritis zu sein. Die niedrigen Werte zum Zeitpunkt P wie auch S, wo alle Parameter erfaßt werden konnten, stehen etwas im Widerspruch zu den vereinzelt stark erhöhten Werten zu den Terminen L, M und N, wo die Werte nur unvollständig erfaßt werden konnten. Zu den Untersuchungsterminen Q und R sind keine Daten vorhanden.

3. Patientin 3 (CG)

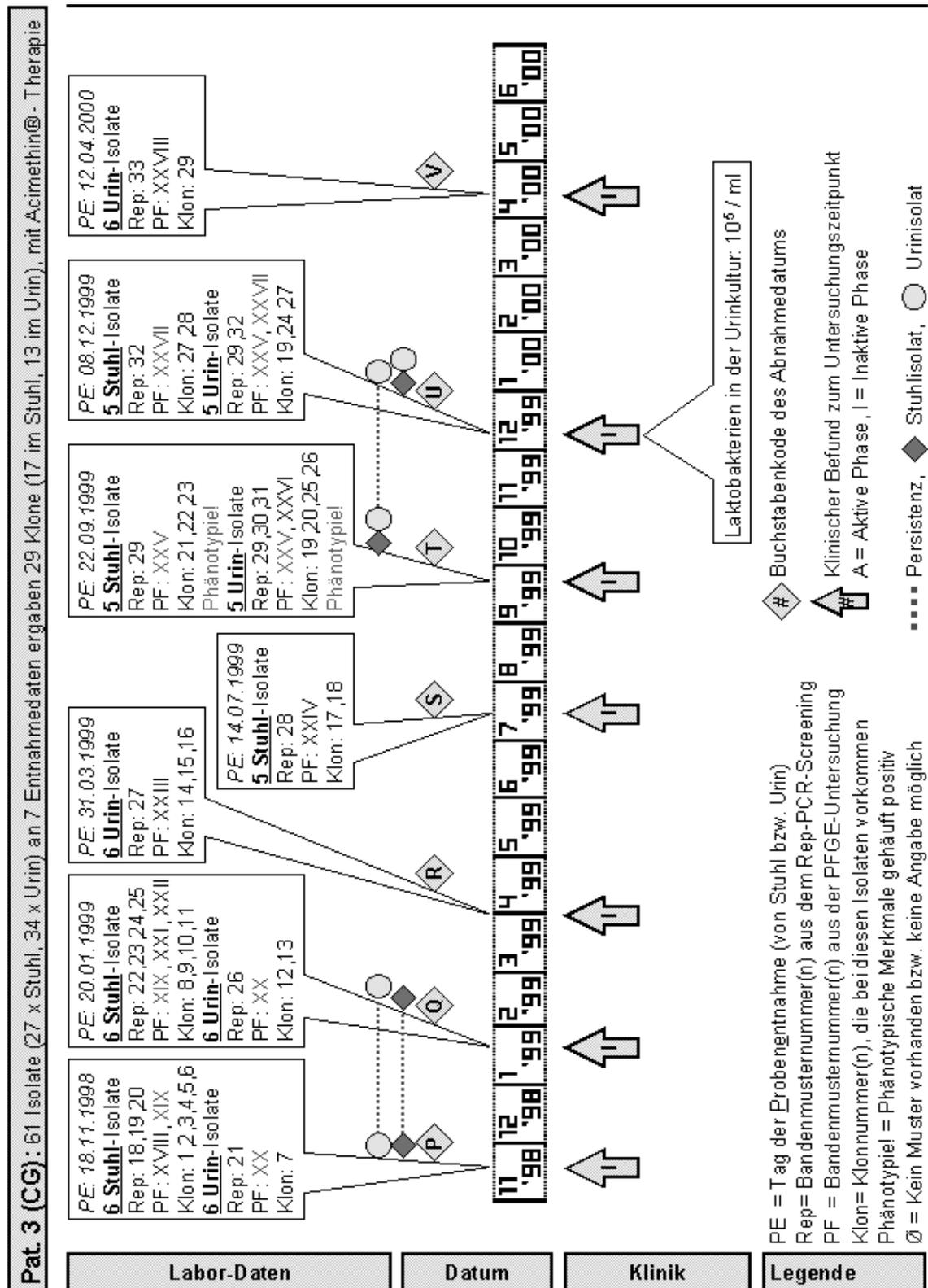


Abbildung IV.14: Verlauf der Untersuchungen bei Pat. 3 (CG)

3.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.15: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 3 (CG)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE		Positive Isolate in den Urin-PE		Positive Isolate insgesamt	
	n = 27	[%]	n = 34	[%]	n = 61	[%]
Hly	n = 13	48,15	n = 4	11,76	n = 17	27,87
<i>hlyA</i>	n = 12	44,44	n = 4	11,76	n = 16	26,23
Pap/Prs	n = 7	25,93	n = 6	17,65	n = 13	21,31
<i>papA</i>	n = 8	29,63	n = 7	20,59	n = 15	24,59
<i>papC</i>	n = 8	29,63	n = 7	20,59	n = 15	24,59
<i>papEF</i>	n = 15	55,56	n = 22	64,71	n = 37	60,66
<i>papG</i> Allel I	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>papG</i> Allel III	n = 11	40,74	n = 16	47,06	n = 27	44,26
Sfa	n = 5	18,52	n = 0	0,00	n = 5	8,20
<i>sfa/focDE</i>	n = 20	74,07	n = 19	55,88	n = 39	63,93
Fim	n = 18	66,67	n = 15	44,12	n = 33	54,10
<i>fimH</i>	n = 17	62,96	n = 25	73,53	n = 42	68,85
K1	n = 13	48,15	n = 11	32,35	n = 24	39,34
<i>kpsMT</i> II	n = 13	48,15	n = 10	29,41	n = 23	37,70
<i>kpsMT</i> III	n = 6	22,22	n = 17	50,00	n = 23	37,70
<i>fyuA</i>	n = 13	48,15	n = 22	64,71	n = 35	57,38
<i>iutA</i>	n = 18	66,67	n = 22	64,71	n = 40	65,57
PAI	n = 8	29,63	n = 7	20,59	n = 15	24,59
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 1	3,70	n = 3	8,82	n = 4	6,56
<i>bmaE</i>	n = 0	0,00	n = 5	14,71	n = 5	8,20
<i>rfc</i>	n = 5	18,52	n = 1	2,94	n = 6	9,84

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.16: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 3 (CG)

Klone (Stuhl: n=17) (Urin: n=13)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
3KL1	P	S	+		+						+			3
3KL2	P	S	+		+	+					+			4
3KL3	P	S	+		+	+								3
3KL4	P	S												0
3KL5	P	S									+			1
3KL6	P	S												0
3KL7	P	U				+				+				2
3KL8 ^a	Q	S	+		+	+								3
3KL9	Q	S	+	+	+	+	+	+		+		+		8
3KL10 ^a	Q	S							+					1
3KL11	Q	S			+									1
3KL12 ^a	Q	U			+	+			+	+				4
3KL13 ^a	Q	U				+	+		+	+				4

IV. Ergebnisse

3KL14	R	U			+	+					+			3
3KL15 ^a	R	U			+	+			+		+			4
3KL16	R	U			+	+			+		+			4
3KL17 ^a	S	S			+	+			+		+			4
3KL18 ^a	S	S				+			+		+			3
3KL19	T	U		+		+	+	+		+	+	+		7
3KL19	U	U		+		+	+	+		+	+	+		7
3KL20	T	U	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	10
3KL21	T	S	+	+	+	+	+	+		+	+	+		9
3KL22	T	S	+	+		+	+	+		+	+	+		8
3KL23	T	S	+	+	+	+	+	+		+	+	+		9
3KL24	U	U		+	+	+	+	+		+	+	+		8
3KL25	T	U	+	+	+	+	+	+		+	+	+		9
3KL26	T	U	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	10
3KL27	U	U			+		+	+		+	+			5
3KL27	U	S			+		+	+		+	+			5
3KL28	U	S			+	+	+	+		+	+		+	7
3KL29	V	U							+		+			2

^a *papEF*(+)

Tabelle IV.17: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 3 (CG)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 17	[%]	n = 13	[%]
<i>hly</i>	n = 8	47,06	n = 3	23,08
<i>pap</i>	n = 4	23,53	n = 5	38,46
<i>sfa/foc</i>	n = 11	64,71	n = 9	69,23
<i>fim</i>	n = 10	58,82	n = 11	84,62
K1	n = 6	35,29	n = 7	53,85
<i>kpsMT II</i>	n = 6	35,29	n = 6	46,15
<i>kpsMT III</i>	n = 3	17,65	n = 5	38,46
<i>fyuA</i>	n = 6	35,29	n = 9	69,23
<i>iutA</i>	n = 10	58,82	n = 10	76,92
PAI	n = 4	23,53	n = 5	38,46
<i>ibeA</i>	n = 1	5,88	n = 2	15,38

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.18: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhlklonen von Pat. 3 (CG)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=17)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
0	2 x	11,76	
1	3 x	17,65	<i>iutA</i> <i>kpsMT II</i> <i>sfa/foc</i>
3	4 x	23,53	<i>hly + sfa/foc + iutA</i> (2 x) <i>hly + sfa/foc + fim</i> <i>fim + kpsMT III + iutA</i>
4	2 x	11,76	<i>hly + sfa/foc + fim + iutA</i> <i>sfa/foc + fim + kpsMT III + iutA</i>
5	1 x	5,88	<i>sfa/foc + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA</i>
7	1 x	5,88	<i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>
8	2 x	11,76	<i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI</i> <i>hly + pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>
9	2 x	11,76	<i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i> (2 x)

Tabelle IV.19: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 3 (CG)

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=13)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
2	2 x	15,38	<i>fim</i> + <i>fyuA</i> <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i>
3	1 x	7,69	<i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>iutA</i>
4	4 x	30,77	<i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>fyuA</i> <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT III</i> + <i>fyuA</i> <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i> (2 x)
5	1 x	7,69	<i>sfa/foc</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i>
7	1 x	7,69	<i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI
8	1 x	7,69	<i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI
9	1 x	7,69	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI
10	2 x	15,38	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (2 x)

3.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

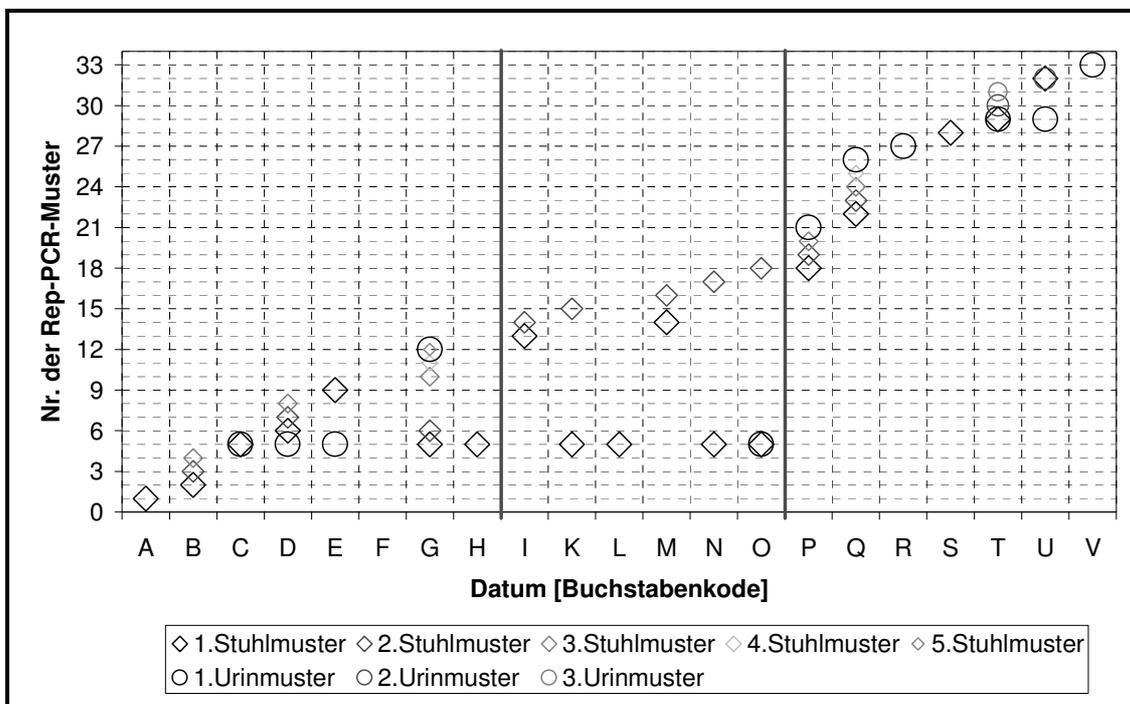


Abbildung IV.15: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 3 (CG)

Man kann aus der chronologischen Darstellung der Rep-PCR-Bandenmuster ersehen, wann ein und dasselbe Muster zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftaucht. Außerdem ist die Herkunft des Isolates bzw. der Isolatengruppe, die ein Bandenmuster bildet, aus Stuhl oder Urin zu erkennen. Zum PE-Datum F gibt es kein Bandenmuster, weil keine Isolate aus den Proben angezüchtet werden konnten. Aus der Abbildung kann man beispielsweise erkennen, daß das Bandenmuster 5 über lange Zeiträume hinweg immer wieder vorkommt, sowohl in Proben aus Stuhl als auch in Proben aus Urin. Zum Zeitpunkt T und U verhält es sich mit Bandenmuster 29 ähnlich. Das Muster 12 kommt gleichzeitig in Proben aus Stuhl und Urin zum Datum G vor.

IV. Ergebnisse

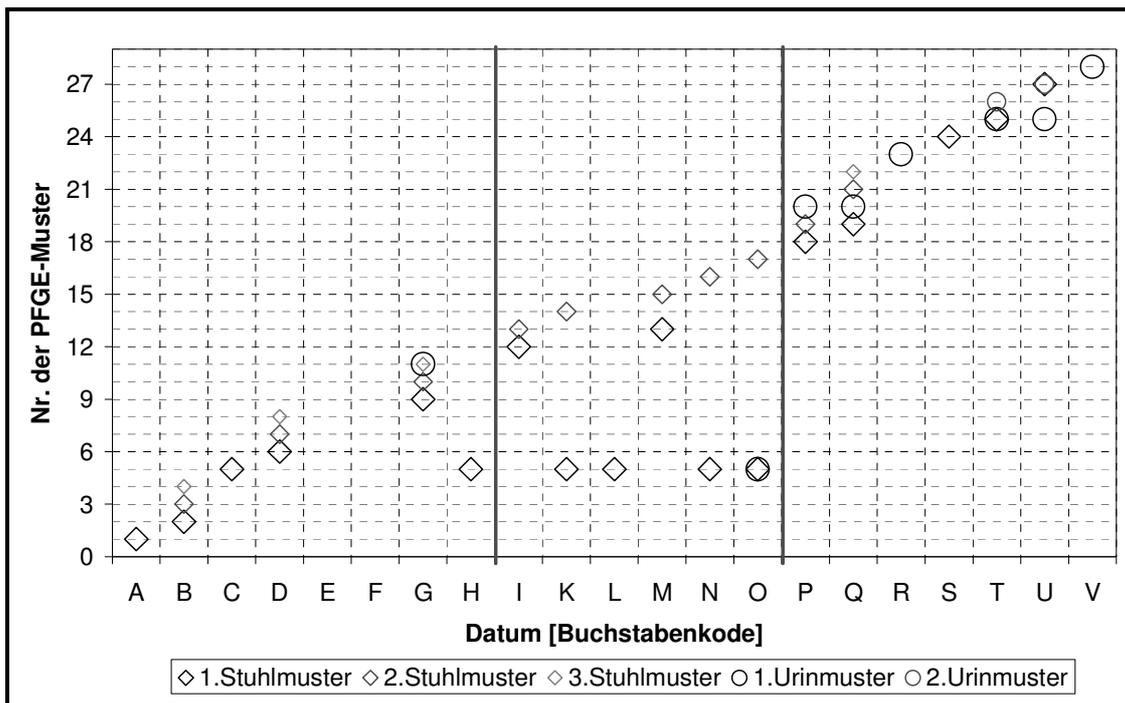


Abbildung IV.16: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 3 (CG)

Die chronologische Anordnung aller PFGE-Bandenmuster zeigt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit PFGE untersuchten Isolate zueinander. Man erkennt Persistenzen nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe. Bei dieser Patientin z.B. fallen die Stämme mit PFGE-Muster V auf. Sie lassen sich vom Zeitpunkt C (in der Stuhlprobe) bis O (in Stuhl- und Urinprobe) nachweisen. PFGE-Muster XXV zeigt eine weitere Persistenz (von T bis U). Zum Zeitpunkt F konnten aus den Proben keine *E. coli* Stämme isoliert werden und zum Zeitpunkt E wurde kein Isolat zur Untersuchung ausgewählt.

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

Zur Abbildung IV.17:

Das Diagramm zeigt das chronologische Auftreten der definierten Klone im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Die Grafik integriert sowohl die Rep-PCR- wie auch die PFGE-Muster. Manche Klone umfassen sowohl Stuhl- als auch Urinisolate und sind somit auf der Abszisse doppelt vertreten. Man sieht auf einen Blick, wenn ein PFGE-Muster bei unterschiedlichen Klonen vorkommt. Klone ohne PFGE-Bandenmuster zeigen, daß kein Isolat zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt wurde. Isolat 3P2 (^a3KL1) ist identisch mit 3Q1 (^a3KL8) des nächsten Abnahmedatums. Die Isolate 3P1U, 3P2U und 3P6U (alle ^b3KL7) sind in analoger Weise mit dem Isolat 3Q6U (^b3KL13), gefunden zum nächsten Untersuchungstermin, identisch. Dasselbe gilt für die Isolate 3T1U und 3U1U (beide ^c3KL19). Die Isolate 3T1U (^d3KL19), 3T5U (^d3KL20) und 3T1 (^d3KL21) sind Varianten und zeigen alle dasselbe PFGE-Muster XXV. Dasselbe gilt analog wieder für zwei Isolate des nächsten PE-Datums: Varianten 3U4U (^e3KL27) und 3U2 (^e3KL28). Sie haben Bandenmuster Nr. XXVII gemeinsam.

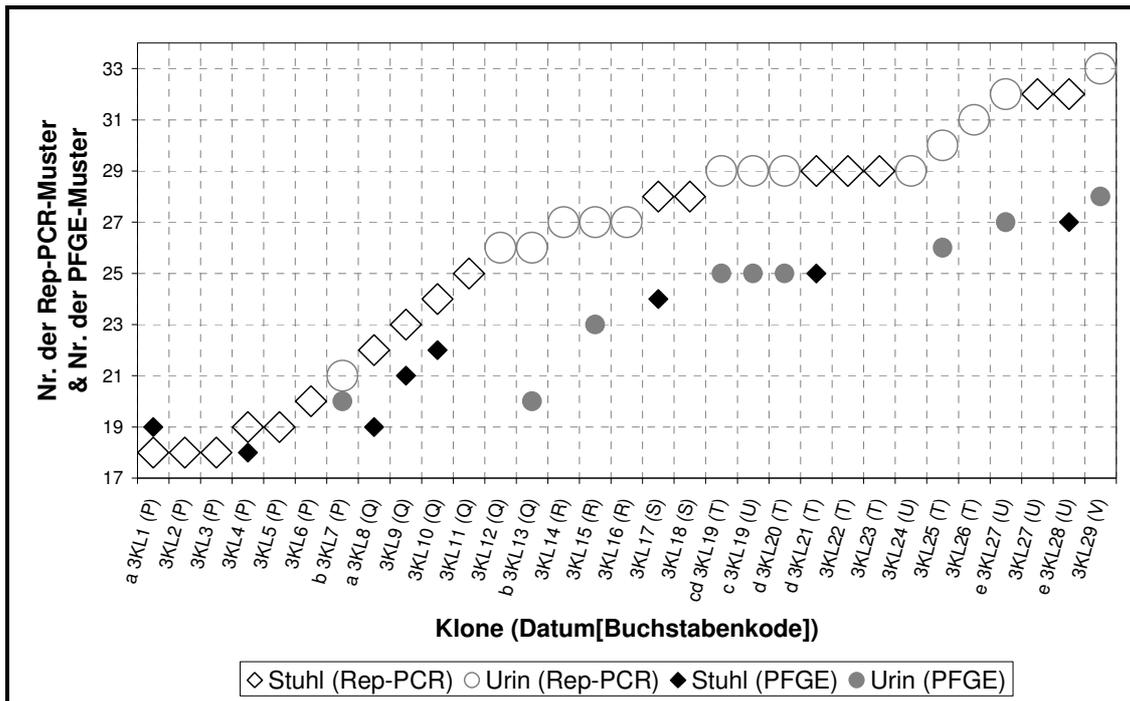


Abbildung IV.17: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 3 (CG)

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Am 18.11.1998 wurde das Stuhlisolat **3P2** (Klon 3KL1) bei dieser Patientin abgenommen und am 20.01.1999 das Stuhlisolat **3Q1** (Klon 3KL8). Beide Isolate zeigen das PFGE-Muster XIX. Somit wurde die Persistenz dieser Varianten im Stuhl für ca. zwei Monate nachgewiesen. Die Abbildung IV.18 zeigt in den Spuren 2 und 3 des ersten Geles die DNA-Bandenmuster der beiden Isolate nebeneinander.

Für dieselben Entnahmedaten wurde auch eine Persistenz unter Varianten aus Urinstämmen festgestellt (**3P1U** und **3Q6U** in den Spuren 4 und 5 des linken Gelfotos von Abb. IV.18). Zum 18.11.1998 wurde bei drei Urinisolaten (alle Klon 3KL7) das PFGE-Muster XX detektiert: bei **3P1U**, **3P2U** und bei **3P6U** (Abb. IV.18, Gel 2). Dasselbe Muster findet sich für das Isolat **3Q6U** (Klon 3KL13) noch einmal wieder, das aus einer Probe vom 20.01.1999 gewonnen wurde. Wie zuvor, so besteht auch hier eine Persistenz für ca. zwei Monate, dieses Mal in Urinproben.

Unter den Proben des Abnahmedatums vom 22.09.1999 befanden sich die beiden Urinisolate **3T1U** und **3T5U** (Klone 3KL19 und 20) und das Stuhlisolat **3T1** (3KL21), die alle das PFGE-Muster XXV aufwiesen und somit als Varianten vorliegen. Die Spuren 2, 4 und 5 des ersten Geles der Abbildung IV.19 zeigen das Muster XXV für die genannten Isolate. Zum nächsten Untersuchungsdatum am 08.12.1999 wurde dieses Bandenmuster nochmals bei Urinisolat **3U1U** (Klon 3KL19, Abb. IV.19, Spur 8)

IV. Ergebnisse

entdeckt. Zum Vergleich ist ein Muster von einem der o.g. Stämme zu sehen. Es liegt hier also der Nachweis vor, daß ein Urinstamm über ca. zehn Wochen dauerhaft vorhanden war. Desweiteren wurden aus der Entnahme vom 08.12.1999 noch das Urinisolat **3U4U** (3KL27) und das Stuhlisolat **3U2** (3KL28) gewonnen (Varianten), deren PFGE-Muster (XXVII) identisch sind (Abb. IV.19, Gel 3).

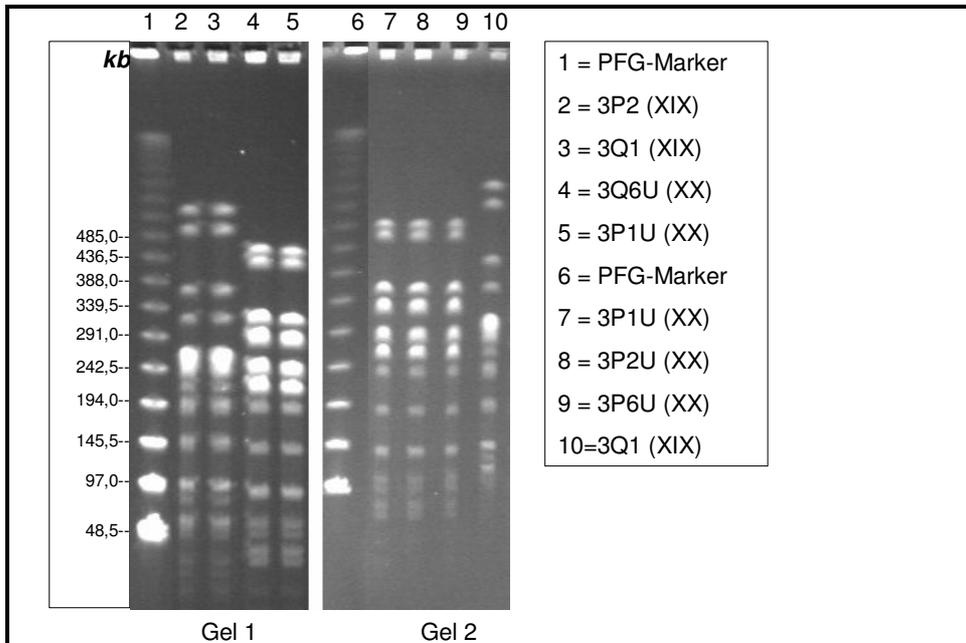


Abbildung IV.18: *Xba*I-Restriktionsmuster persistierender Stämme bei Pat. 3 (CG)

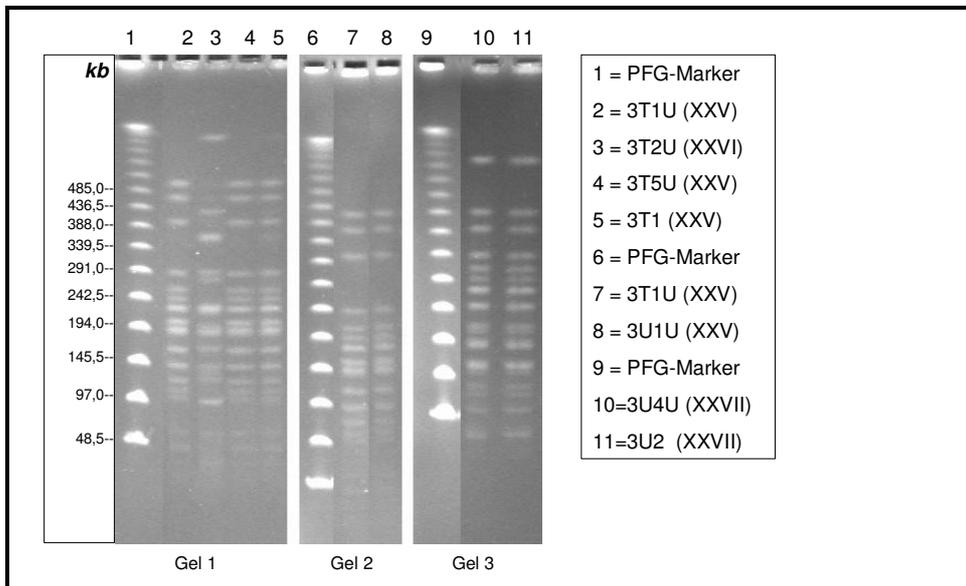


Abbildung IV.19: *Xba*I-Restriktionsmuster persistierender Stämme bei Pat. 3 (CG)

Gel 1 und 3 zeigen Stämme, die zum selben Zeitpunkt in Stuhl und Urin nachweisbar waren. In Gel 2 sieht man einen Urinstamm, der zu verschiedenen Zeiten gefunden wurde.

➤ Fazit:

Bei Pat. 3 (CG) wurden in dieser Arbeit drei persistierende Stämme gefunden, die jeweils nicht länger als zehn Wochen nachgewiesen werden konnten. An zwei verschiedenen Untersuchungsdaten wurden je ein gleicher Stamm sowohl in Urin als auch in Stuhl entdeckt.

3.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Diese Patientin war über den gesamten Beobachtungszeitraum klinisch unauffällig. Zum Untersuchungstermin U wurde in der Urinkultur eine leicht erhöhte Zahl von Lactobakterien gefunden: 10^5 Keime pro ml Urin. Dieser Wert gilt als beweisend für eine Bakteriurie. Auch diese Patientin hatte während des gesamten Untersuchungszeitraumes dieser Arbeit Acimethin® als Dauermedikation. Nachstehendes Diagramm zeigt die Werte des Nephrologischen Labors zu den einzelnen Untersuchungsterminen.

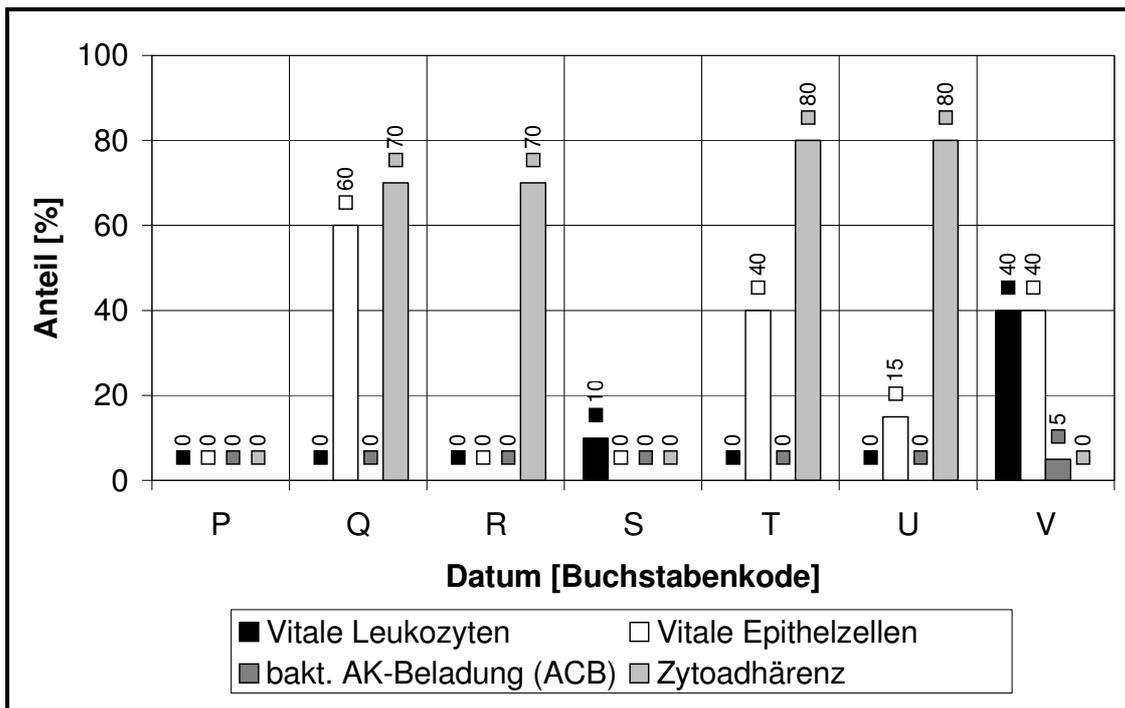


Abbildung IV.20: Nephrologisches Labor der Pat. 3 (CG)

Die vereinzelt erhöhten Werte im Diagramm lassen sich nicht mit dem subjektiven Befinden der Patientin überein bringen. Eine gewisse bakterielle Besiedlung scheint für die Patientin normal und dürfte am ehesten Ausdruck der chronischen Pyelonephritis sein.

4.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.20: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 5 (EM)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE		Positive Isolate in den Urin-PE		Positive Isolate insgesamt	
	n = 12	[%]	n = 13	[%]	n = 25	[%]
Hly	n = 0	0,00	n = 6	46,15	n = 6	24,00
<i>hlyA</i>	n = 0	0,00	n = 6	46,15	n = 6	24,00
Pap/Prs	n = 6	50,00	n = 1	7,69	n = 7	28,00
<i>papA</i>	n = 1	8,33	n = 11	84,62	n = 12	48,00
<i>papC</i>	n = 1	8,33	n = 6	46,15	n = 7	28,00
<i>papEF</i>	n = 1	8,33	n = 6	46,15	n = 7	28,00
<i>papG</i> Allel I	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>papG</i> Allel III	n = 0	0,00	n = 6	46,15	n = 6	24,00
Sfa	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>sfa/focDE</i>	n = 0	0,00	n = 6	46,15	n = 6	24,00
Fim	n = 6	50,00	n = 13	100,00	n = 19	76,00
<i>fimH</i>	n = 11	91,67	n = 13	100,00	n = 24	96,00
K1	n = 6	50,00	n = 7	53,85	n = 13	52,00
<i>kpsMT</i> II	n = 6	50,00	n = 13	100,00	n = 19	76,00
<i>kpsMT</i> III	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>fyuA</i>	n = 6	50,00	n = 13	100,00	n = 19	76,00
<i>iutA</i>	n = 11	91,67	n = 7	53,85	n = 18	72,00
PAI	n = 1	8,33	n = 6	46,15	n = 7	28,00
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 5	41,67	n = 13	100,00	n = 18	72,00
<i>bmaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>rfa</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.21: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 5 (EM)

Klone (Stuhl: n=4) (Urin: n=3)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	Pathogenitätsfaktoren											Anzahl pos. PF
			<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	
5KL1	D	U	+	+	+	+			+		+	+	+	8
5KL2	D	S				+						+		2
5KL3	D	S												0
5KL4	E	S		+		+	+	+		+	+	+		7
5KL5	E	U				+	+	+		+	+		+	6
5KL5	F	S				+	+	+		+	+		+	6
5KL6 ^a	F	U				+	+	+		+	+		+	6

^a *papA*(+)

IV. Ergebnisse

Tabelle IV.22: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 5 (EM)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 4	[%]	n = 3	[%]
<i>hly</i>	n = 0	0,00	n = 1	33,33
<i>pap</i>	n = 1	25,00	n = 1	33,33
<i>sfa/foc</i>	n = 0	0,00	n = 1	33,33
<i>fim</i>	n = 3	75,00	n = 3	100,00
K1	n = 2	50,00	n = 2	66,67
<i>kpsMT II</i>	n = 2	50,00	n = 3	100,00
<i>kpsMT III</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>fyuA</i>	n = 2	50,00	n = 3	100,00
<i>iutA</i>	n = 3	75,00	n = 2	66,67
PAI	n = 1	25,00	n = 1	33,33
<i>ibeA</i>	n = 1	25,00	n = 3	100,00

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.23: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhklonen von Pat. 5 (EM)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=4)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
0	1 x	25,00	
2	1 x	25,00	<i>fim + iutA</i>
6	1 x	25,00	<i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>
7	1 x	25,00	<i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>

Tabelle IV.24: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 5 (EM)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=3)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
6	2 x	66,67	<i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA (2 x)</i>
8	1 x	33,33	<i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>

4.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

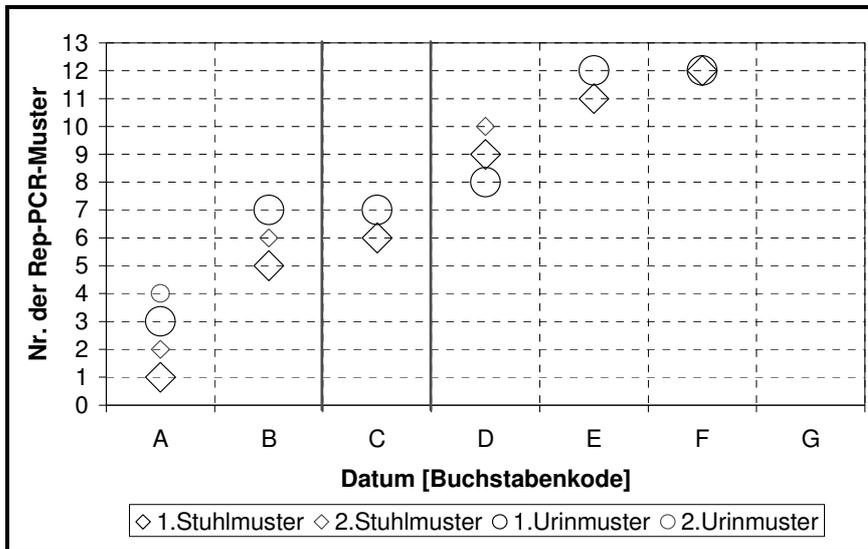


Abbildung IV.22: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 5 (EM)

Aus der chronologischen Darstellung der Rep-PCR-Bandenmuster kann man ersehen, wann gleiche Muster auftauchen. Auch die Herkunft aus Stuhl oder Urin des Isolates bzw. der Isolaten-Gruppe, die ein Bandenmuster bildet, ist zu erkennen. Beispielsweise kommt das Muster 12 zum Zeitpunkt E (in Urinproben) und zum Zeitpunkt F (in Stuhl- und Urinproben) vor. Zum Datum G konnten keine Isolate aus den Proben angezchtet werden.

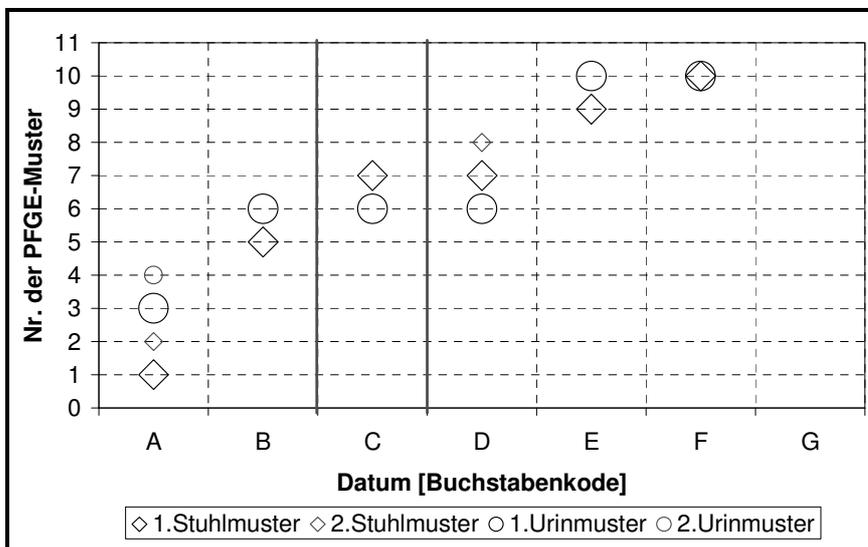


Abbildung IV.23: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 5 (EM)

Die chronologische Anordnung der PFGE-Bandenmuster stellt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit dieser Methode untersuchten Isolate zueinander dar. Man erkennt Persistenzen und kann sie nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe unterscheiden. Bandenmuster VI persistiert über den Zeitraum B bis D, jedoch nur in Urinstämmen, während Muster X zum Datum F auch in der Stuhlprobe nachweisbar ist. Analog zur vorherherigen Grafik gibt es zum Datum G keine Muster, weil aus den Proben keine Isolate angezchtet werden konnten.

IV. Ergebnisse

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

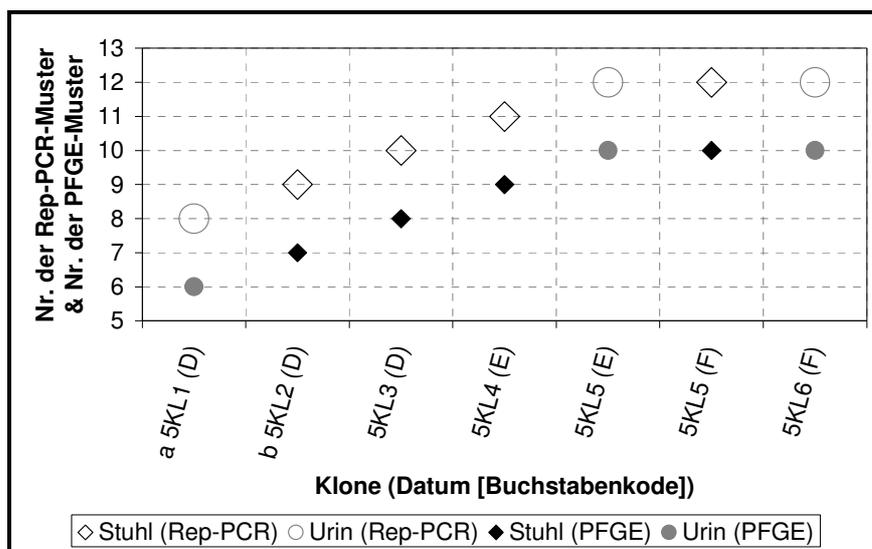


Abbildung IV.24: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 5 (EM)

Das Diagramm zeigt das chronologische Auftreten der definierten Klone im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Es sind sowohl die Rep-PCR- wie auch die PFGE-Muster dargestellt. Manche Klone kommen sowohl in Stuhl- wie auch in Urinproben vor und sind somit auf der Abszisse doppelt vertreten. Bei Klonen ohne ein PFGE-Bandenmuster wurde kein Isolat zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt. Das Isolat 5D1U (^a5KL1) aus dieser Arbeit zeigt das PFGE-Muster VI zusammen mit dem Isolat 5B1U aus der Arbeit von Brauchle (2002) und den Isolaten 5C1U bis 5C3U und 5C6U aus der Arbeit von Maibaum (2003). Das PFGE-Muster VII hat das Isolat 5D1 (^b5KL2) mit den Isolaten 5C1 und 5C6 (Maibaum, 2003) gemeinsam.

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Das Urinisolat **5D1U** (5KL1) vom 19.05.1999 zeigt das gleiche PFGE-Muster wie das Isolat **5B1U** vom 10.12.1997 aus der Arbeit von Brauchle (2002). Diese Muster sind auch identisch mit denen der Isolate **5C1U**, **5C2U**, **5C3U** und **5C6U** vom 25.03.1998 aus der Arbeit von Maibaum (2003). Das bedeutet, daß Urinstämme mit dem PFGE-Muster VI bei dieser Patientin über einen Zeitraum von 17 Monaten persistierten. In der nächsten Abbildung sind die DNA-Bandenmuster für die Urinisolate nebeneinander dargestellt.

Vom 19.05.1999 gibt es ein weiteres Isolat, dessen PFGE-Muster mit einem schon früher gefundenen Stamm übereinstimmt. Es handelt sich um das Stuhlisolat **5D1** (5KL2), dessen PFGE-Muster (VII) bereits von Maibaum (2003) erstmals detektiert wurde, und zwar bei den Isolaten **5C1** und **5C6** am 25.03.1998. Das entspricht also einer Persistenz von fast vierzehn Monaten (siehe Abb. IV.25, Gel 1, Spuren 5 und 6). Weiterhin wurde bei dieser Patientin am 13.10.1999 das Urinisolat **5E1U** (5KL5) gefunden, das sich als Variante mit dem Urinisolat **5F1U** (5KL6), das am 05.01.2000

isoliert wurde, das PFGE-Muster X teilt. Diese Urinstämme sind somit für die Dauer von fast drei Monaten nachgewiesen worden. Gleichzeitig konnte das PFGE-Muster X auch noch für ein Stuhlisolat zum Abnahmedatum am 05.01.2000 nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um das Isolat **5F1** (5KL5). Die DNA-Bandenmuster dieses Stuhlstammes und der beiden o.g. Urinstämme sind in Gel 2 der Abbildung IV.25 nebeneinander zu sehen.

➤ Fazit:

Bei Pat. 5 (EM) sind drei unterschiedlich lange Persistenzen entdeckt worden: eine für zwei Monate, eine für zehn Monate und eine Persistenz für 17 Monate. Außerdem wurde zum Zeitpunkt F derselbe Stamm sowohl in Stuhl als auch in Urin nachgewiesen.

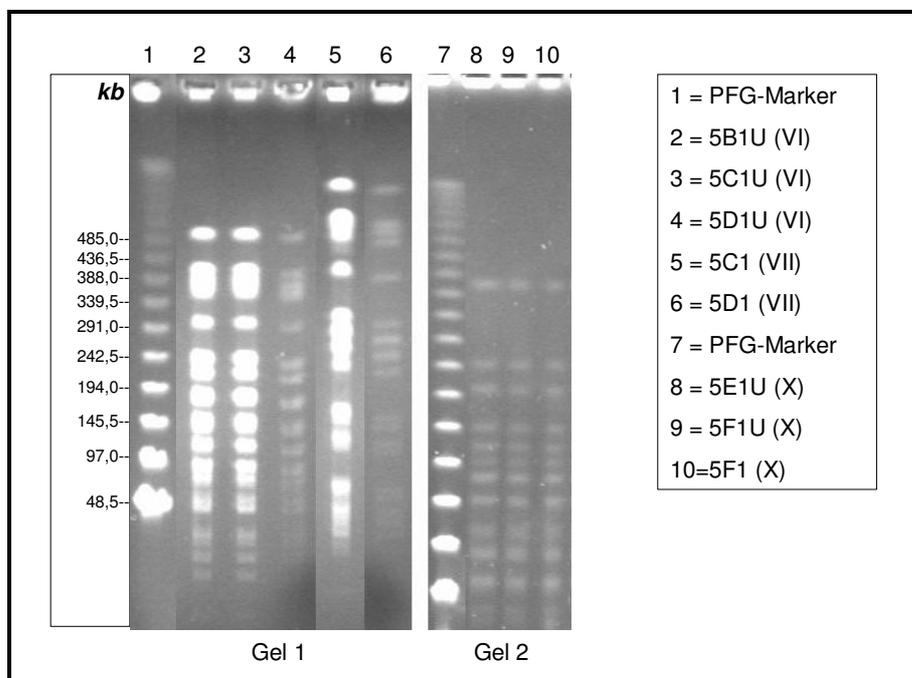


Abbildung IV.25: XbaI-Restriktionsmuster persistierender *E. coli* Stämme bei Pat. 5 (EM)

4.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Diese Probandin hatte zu ihren Terminen durchweg negative Urinkulturen, trotz einer starken bakteriellen Konzentration im Urinsediment zum Zeitpunkt D. Für sie wurde kurz nach dem Untersuchungstermin E das Antibiotikum Cotrimoxazol für fünf Tage verordnet, weil sie klinische Symptome einer neuerlichen Harnwegsinfektion bot. Die Patientin unterzog sich im Februar 2000 einer Ureterstumpfresektion (ein Monat nach Termin F und zwei Monate vor Termin G). Der Stumpf, der Überbleibsel einer (einseitigen) Nephrektomie (von 1981) war, stand im Verdacht Keimreservoir für ihr chronisches Leiden zu sein. Die Patientin hatte *keine* Acimethin®-Dauerprophylaxe. Im Anschluß ist nun das Diagramm zum zeitlichen Verlauf der nephrologischen Laborparameter für diese Patientin zu sehen.

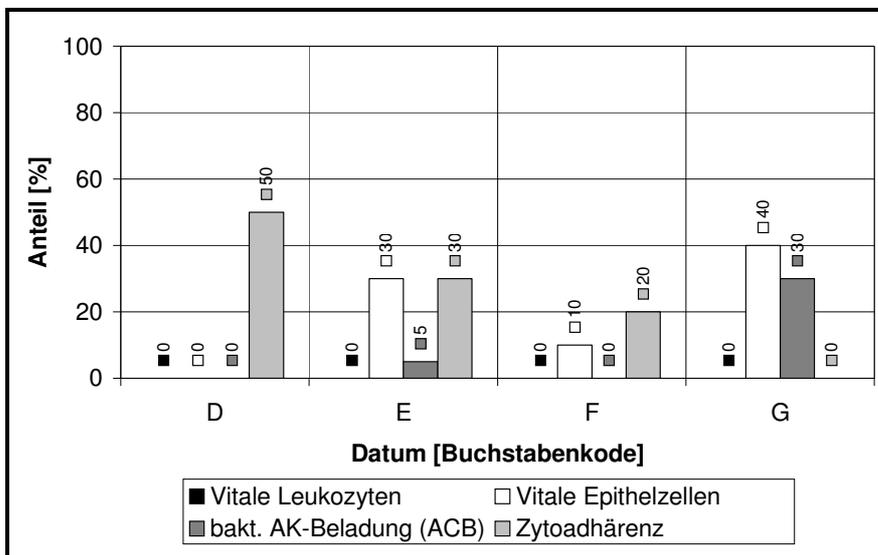


Abbildung IV.26: Nephrologisches Labor der Pat. 5 (EM)

Alle Laborparameter scheinen lediglich ein Spiegel der chronischen Grunderkrankung zu sein und korrelieren scheinbar gut mit dem Wohlbefinden der Patientin.

IV. Ergebnisse

5.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.25: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 8 (US)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE n = 31		Positive Isolate in den Urin-PE n = 32		Positive Isolate insgesamt n = 63	
		[%]		[%]		[%]
Hly	n = 8	25,81	n = 27	84,38	n = 35	55,56
<i>hlyA</i>	n = 8	25,81	n = 27	84,38	n = 35	55,56
Pap/Prs	n = 0	0,00	n = 31	96,88	n = 31	49,21
<i>papA</i>	n = 8	25,81	n = 25	78,13	n = 33	52,38
<i>papC</i>	n = 11	35,48	n = 31	96,88	n = 42	66,67
<i>papEF</i>	n = 9	29,03	n = 27	84,38	n = 36	57,14
<i>papG</i> Allel I	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>papG</i> Allel III	n = 10	32,26	n = 27	84,38	n = 37	58,73
Sfa	n = 0	0,00	n = 17	53,13	n = 17	26,98
<i>sfa/focDE</i>	n = 10	32,26	n = 27	84,38	n = 37	58,73
Fim	n = 19	61,29	n = 28	87,50	n = 47	74,60
<i>fimH</i>	n = 28	90,32	n = 28	87,50	n = 56	88,89
K1	n = 5	16,13	n = 21	65,63	n = 26	41,27
<i>kpsMT</i> II	n = 18	58,06	n = 27	84,38	n = 45	71,43
<i>kpsMT</i> III	n = 5	16,13	n = 0	0,00	n = 5	7,94
<i>fyuA</i>	n = 17	54,84	n = 27	84,38	n = 44	69,84
<i>iutA</i>	n = 22	70,97	n = 11	34,38	n = 33	52,38
PAI	n = 10	32,26	n = 30	93,75	n = 40	63,49
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 14	45,16	n = 18	56,25	n = 32	50,79
<i>bmaE</i>	n = 1	3,23	n = 0	0,00	n = 1	1,59
<i>rfc</i>	n = 0	0,00	n = 5	15,63	n = 5	7,94

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.26: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 8 (US)

Klone (Stuhl: n=19) (Urin: n=11)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
8KL1	H	S				+				+				2
8KL2	H	S	+	+	+	+		+		+	+	+		8
8KL2	H	U	+	+	+	+		+		+	+	+		8
8KL2	I	S	+	+	+	+		+		+	+	+		8
8KL3	I	S	+	+	+	+		+		+	+	+		8
8KL4	I	S			+	+				+		+	+	5
8KL5	K	S				+					+			2
8KL6 ^{ab}	L	U	+		+	+				+		+		5
8KL7	L	U	+	+	+	+				+		+		6
8KL8	L	S				+		+		+			+	4
8KL9	L	S				+		+		+			+	4

8KL10	L	S				+		+	+	+			+	5
8KL11	L	S				+		+	+	+			+	5
8KL12	M	U				+	+	+		+	+		+	6
8KL13	M	U		+		+	+	+		+	+	+	+	8
8KL14	M	U		+		+	+	+		+	+	+		7
8KL15	M	S		+		+		+		+	+	+	+	7
8KL16	M	S				+			+		+		+	4
8KL17	M	S				+					+			2
8KL18 ^{ab}	M	S				+			+	+	+			4
8KL19	M	S				+			+		+			3
8KL20 ^a	N	U	+		+		+	+				+	+	6
8KL21	N	U	+	+	+	+	+	+				+	+	8
8KL22 ^a	N	U	+		+		+	+					+	5
8KL23	N	S					+	+			+		+	4
8KL24	N	S					+	+	+			+		5
8KL25	O	U	+	+	+	+	+	+		+		+	+	9
8KL26 ^a	N	S	+		+	+	+	+					+	6
8KL27	N	S					+	+			+		+	4
8KL28	N	S					+	+			+		+	4
8KL29	O	U	+	+	+	+	+	+		+		+	+	9
8KL29	P	U	+	+	+	+	+	+		+		+	+	9

^a *papC*(+) ^b *papEF*(+)

Tabelle IV.27: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 8 (US)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 19	[%]	n = 11	[%]
<i>hly</i>	n = 3	15,79	n = 8	72,73
<i>pap</i>	n = 3	15,79	n = 7	63,64
<i>sfa/foc</i>	n = 4	21,05	n = 8	72,73
<i>fim</i>	n = 16	84,21	n = 9	81,82
K1	n = 5	26,32	n = 8	72,73
<i>kpsMT II</i>	n = 12	63,16	n = 9	81,82
<i>kpsMT III</i>	n = 5	26,32	n = 0	0,00
<i>fyuA</i>	n = 10	52,63	n = 8	72,73
<i>iutA</i>	n = 12	63,16	n = 4	36,36
PAI	n = 4	21,05	n = 9	81,82
<i>ibeA</i>	n = 12	63,16	n = 7	63,64

IV. Ergebnisse

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.28: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhlklonen von Pat. 8 (US)

Pos. PF	Klon-anzahl	in % (n=19)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
2	3 x	15,79	<i>fim</i> + <i>fyuA</i> <i>fim</i> + <i>iutA</i> (2 x)
3	1 x	5,26	<i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i>
4	7 x	36,84	<i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>ibeA</i> (2 x) <i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i> <i>fim</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i> (3 x)
5	4 x	21,05	<i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i> <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>kpsMT III</i> + <i>fyuA</i> + <i>ibeA</i> (2 x) <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i>
6	1 x	5,26	<i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>ibeA</i>
7	1 x	5,26	<i>pap</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i>
8	2 x	10,53	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI (2 x)

Tabelle IV.29: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 8 (US)

Pos. PF	Klon-anzahl	in % (n=11)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
5	2 x	18,18	<i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>fyuA</i> + PAI <i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>ibeA</i>
6	3 x	27,27	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>fyuA</i> + PAI <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i> <i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + PAI + <i>ibeA</i>
7	1 x	9,09	<i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI
8	3 x	27,27	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI <i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i> <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + PAI + <i>ibeA</i>
9	2 x	18,18	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (2 x)

5.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

Zur Abbildung IV.28:

Man kann aus der chronologischen Darstellung der Bandenmuster aus der Rep-PCR ersehen, wann ein und dasselbe Muster zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftaucht. Außerdem ist die Herkunft des Isolates bzw. der Isolatengruppe, die ein Bandenmuster bildet, aus Stuhl oder Urin zu erkennen. Aus diesem Diagramm erkennt man beispielsweise, daß das Rep-PCR-Muster 33 von Zeitpunkt N, wo es in Stuhl- und Urinprobe vorkommt, bis zum nächsten Zeitpunkt O, wo es in der Urinprobe vorkommt, nachweisbar ist.

Zur Abbildung IV.29:

Die chronologische Ordnung der unterschiedlichen Bandenmuster aus der Untersuchung mit PFGE zeigt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit dieser Methode untersuchten Isolate zueinander. Man erkennt persistierende Stämme und kann sie nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe unterscheiden. Bei dieser Patientin ist das PFGE-Muster XXVI besonders interessant: Es wird sowohl in Stämmen der Stuhl- als auch Urinprobe des Datums N gefunden und wird noch zu zwei weiteren Untersuchungsterminen (O und P) in Urinstämmen gefunden. Ansonsten zeigt das Diagramm die Persistenz von drei Stuhlstämmen, nämlich derjenigen Stämme mit den PFGE-Mustern I, V und XIV über jeweils zwei Abnahmedaten hinweg.

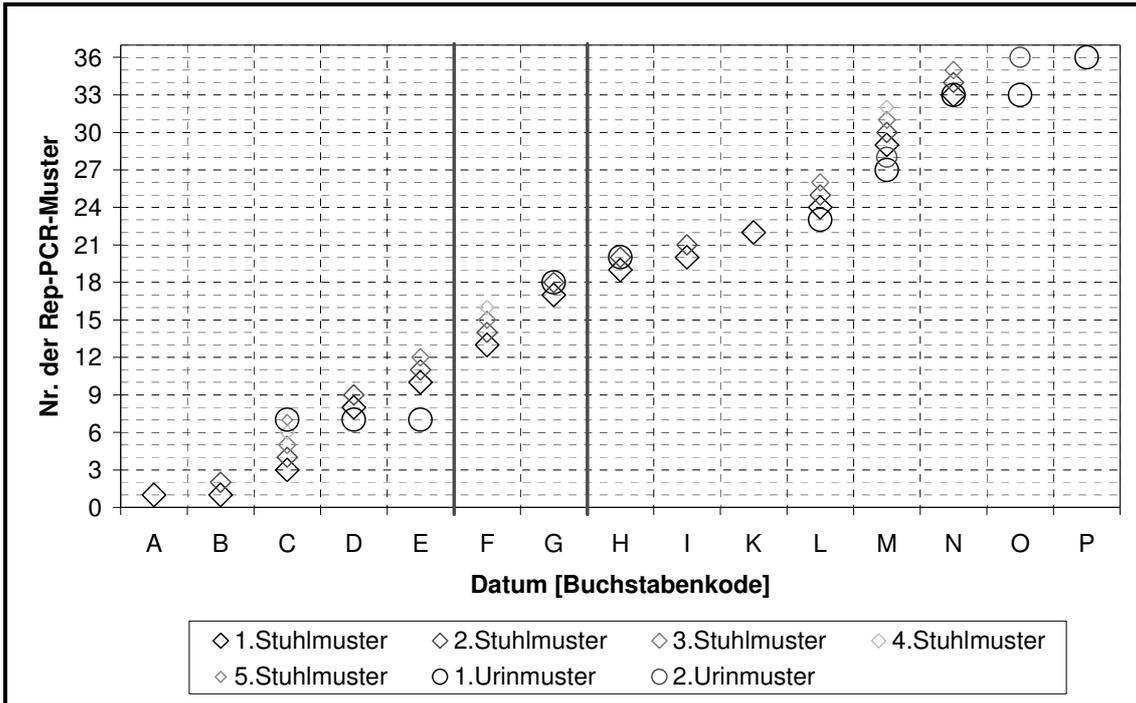


Abbildung IV.28: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 8 (US)

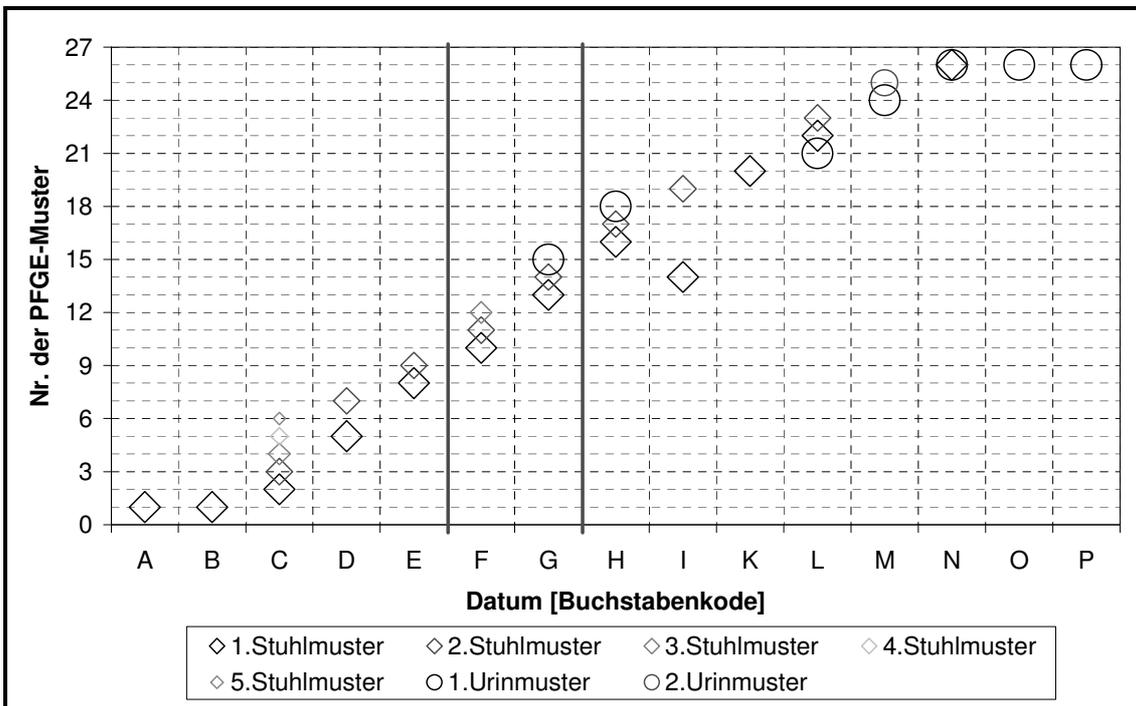


Abbildung IV.29: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 8 (US)

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

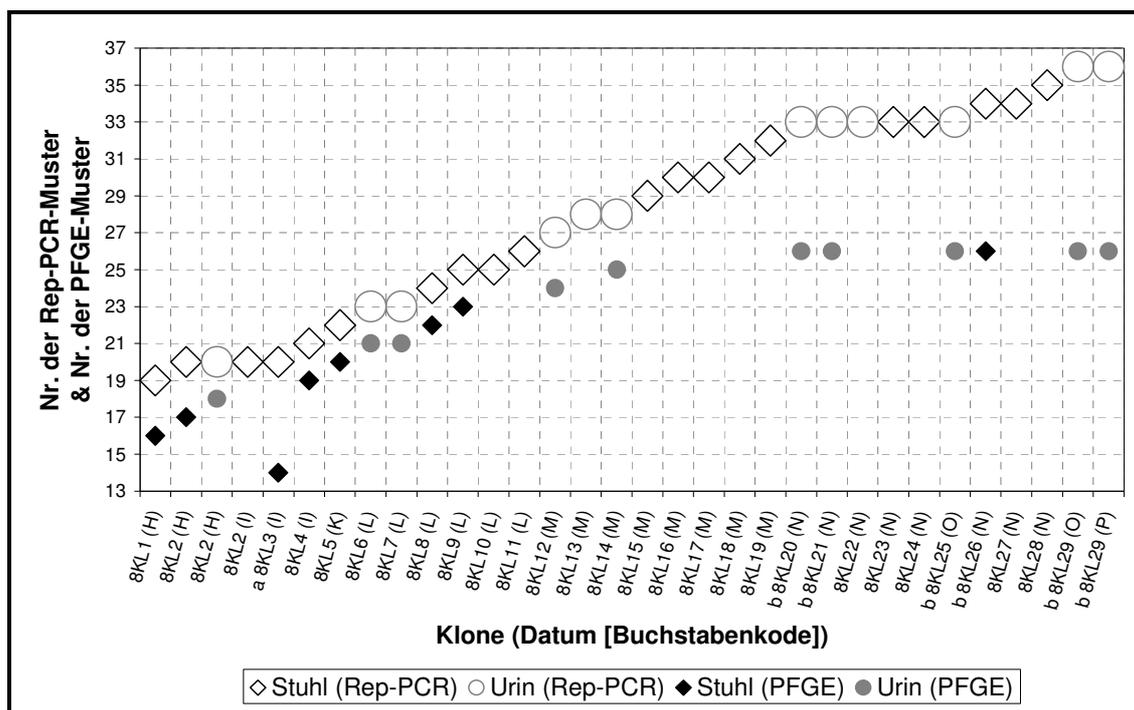


Abbildung IV.30: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 8 (US)

Die Grafik zeigt das chronologische Auftreten der definierten Klone im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Manche Klone kommen sowohl in Stuhl- wie auch in Urinproben vor und sind somit auf der Abszisse doppelt vertreten. Die Abbildung integriert die Rep-PCR- wie die PFGE-Musternummern. Bei Klone ohne ein PFGE-Bandenmuster wurde kein Isolat zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt. Das Isolat 8I1 (^a8KL3) und das Isolat 8G2 aus der Arbeit von Maibaum (2003) zeigen beide das PFGE-Muster XIV. Die ab dem Datum N definierten Klone mit den Isolaten 8N1U (^b8KL20), 8N3U (^b8KL21), 8N1 (^b8KL26), 8O1U (^b8KL25), 8O2U (^b8KL29) und 8P1U (^b8KL29) zeigen alle PFGE-Muster XXVI.

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Das PFGE-Muster mit der Nummer XIV wurde bereits für das Stuhlisolat **8G2** in der Arbeit von Maibaum (2003) am 01.10.1998 erstmals entdeckt. Am 31.03.1999 fand sich für das Stuhlisolat **8I1** (Klon 8KL3) dasselbe PFGE-Muster. Der Stämme mit dem PFGE-Muster XIV persistierten also für fast sechs Monate (siehe Abb. IV.31, Gel 1).

Ab dem Abnahmedatum 19.01.2000 (N) kann für alle weiteren Isolate, die zur Untersuchung durch die PFGE ausgewählt worden sind, nur noch ein einziges PFGE-Muster (Nummer XXVI) nachgewiesen werden. Es handelt sich also immer um verschiedene Varianten. Zum Abnahmedatum N kommt das Muster sowohl in Stuhl- als auch in Urinstämmen vor. Zwei Urinisolate haben den Schlüssel **8N1U** (8KL20), **8N3U** (8KL21) und das Stuhlisolat hat den Code **8N1** (8KL26).

An den beiden darauf folgenden Abnahmedaten (O und P) konnten Isolate nur aus Urin gewonnen werden. Am 29.03.2000 zeigten die Isolate **8O1U** (8KL25), **8O2U** (8KL29) das Muster XXVI (Varianten) und am 21.06.2000 zeigte Isolat **8P1U** (8KL29) auch jenes DNA-Bandenmuster. Hier wird also die Persistenz von Urinstämmen, die auch in Stuhl gefunden wurden, über fünf Monate hinweg bewiesen. Die Abbildung IV.31 gibt in Gel 2 für alle genannten Isolate die entsprechenden PFGE-Muster wieder.

➤ Fazit:

Ein Stuhlstamm persistierte über sechs Monate hinweg und ein Stamm in Stuhl und Urin persistierte für weitere fünf Monate in Proben aus Urin.

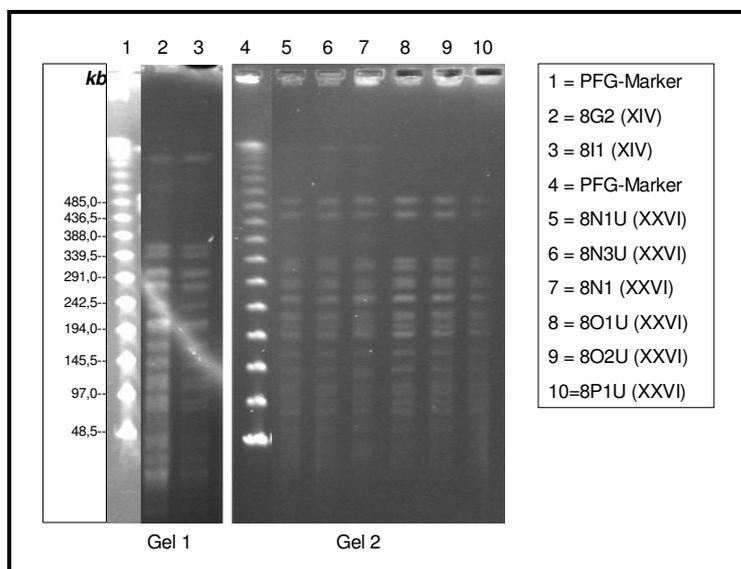


Abbildung IV.31: *XbaI*-Restriktionsmuster persistierender *E. coli* Stämme bei Pat. 8 (US)

Das Gel 1 zeigt einen Stamm, der zweimal in Stuhlproben zu unterschiedlichen Zeiten auftauchte. Das Gel 2 zeigt einen Stamm, der sowohl in Stuhl- als auch in Urinproben zu verschiedenen Untersuchungen zu finden war.

Ähnlichkeiten von PFGE-Mustern innerhalb der PFGE-Ergebnisse des gesamten Studienzeitraumes

Das Stuhlisolat **8I1** (Muster XIV) vom 31.03.1999 zeigt in seinem PFGE-Muster sehr große Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Muster des Isolates **8H2** (PFGE-Muster XVII), was am 02.12.1998 gewonnen wurde. Die Ähnlichkeit (Markierung) der beiden *XbaI*-Restriktionsmuster veranschaulicht die nachfolgende Abbildung.

IV. Ergebnisse

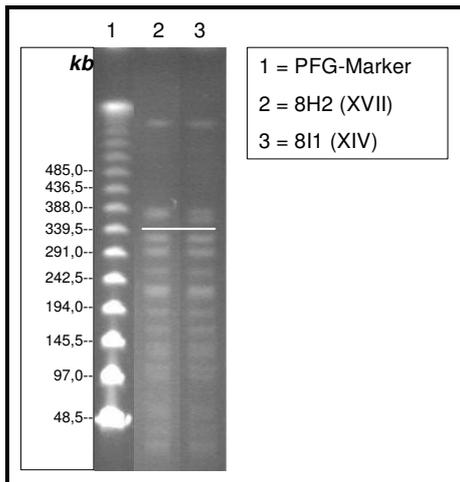


Abbildung IV.32: Ähnliche PFGE-Muster bei Pat. 8 (US)

5.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Die Probandin hatte zwei klinisch aktive Phasen im Untersuchungszeitraum. Die erste Phase begann ca. drei Wochen vor dem Untersuchungstermin K, in der sie dann von sich aus das Antibiotikum Tavanic® einnahm. Die zweite aktive Phase führte die Patientin zum Untersuchungstermin N. Hier konnte *E. coli* in der Urinkultur nachgewiesen werden. Eine Acimethin®-Prophylaxe gehörte zur Standardmedikation der Patientin. Das Diagramm zeigt den Verlauf wichtiger nephrologischer Laborparameter.

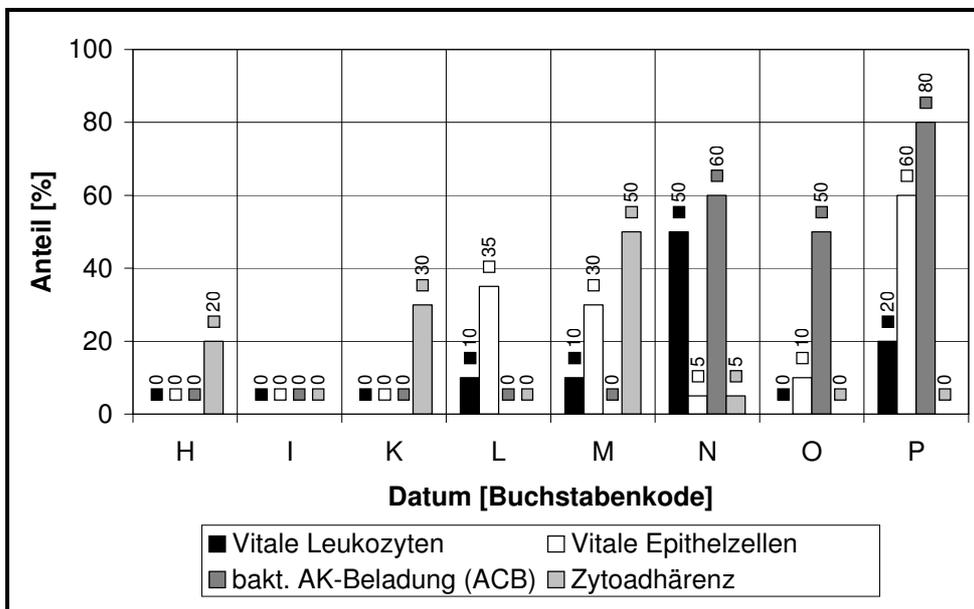


Abbildung IV.33: Nephrologisches Labor der Pat. 8 (US)

Die Werte sind zum Zeitpunkt N, der zweiten HWI-Exazerbation innerhalb des Beobachtungszeitraumes, deutlich erhöht. Jedoch zeigen auch Werte zu anderen Kontrollterminen eine Erhöhung, ohne daß sich die Patientin in ihrem Befinden eingeschränkt fühlte. Die hohen Werte scheinen dann v.a. die chronische Grunderkrankung wiederzuspiegeln.

6. Patientin 11 (SH)

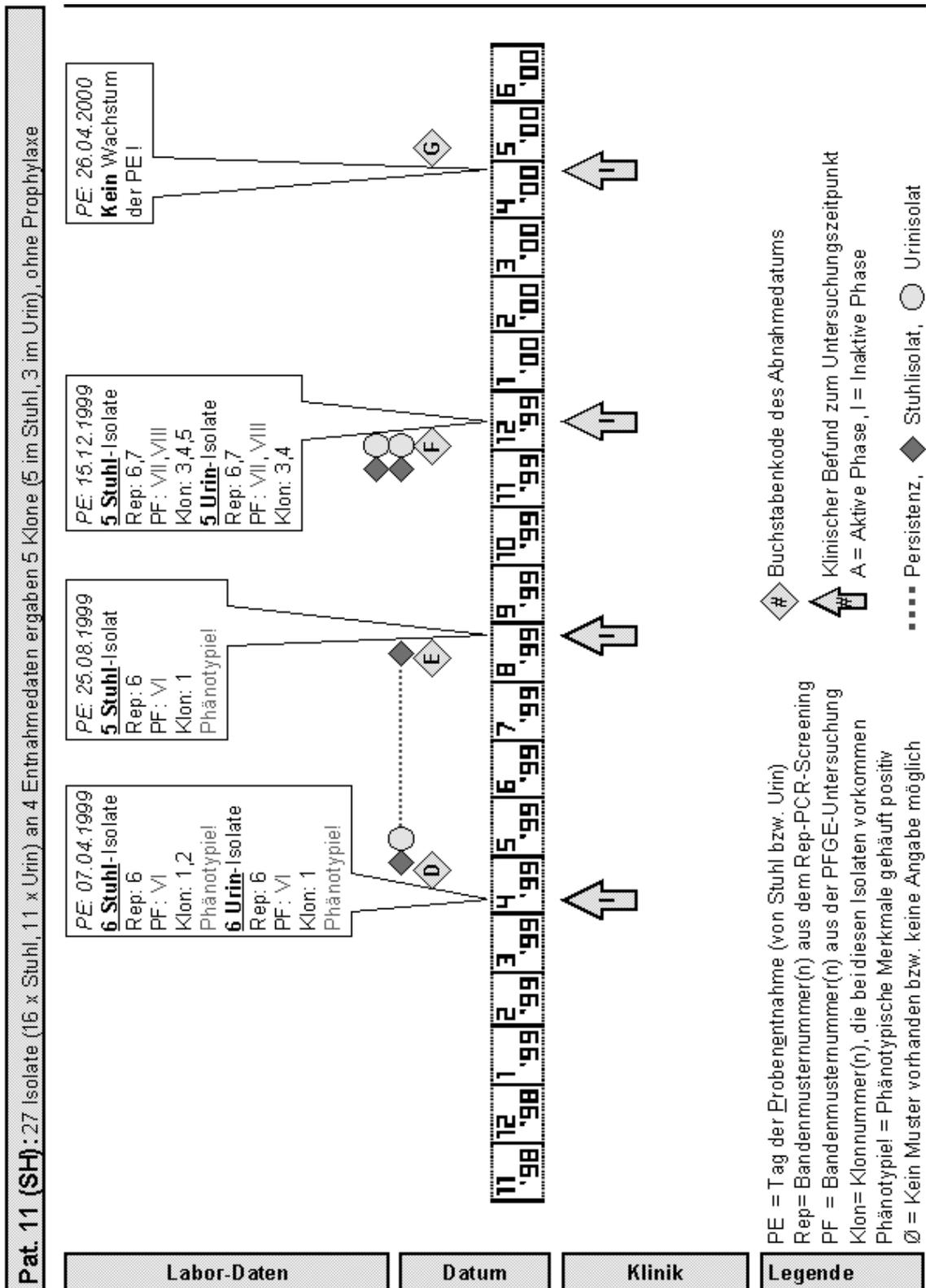


Abbildung IV.34: Verlauf der Untersuchungen bei Pat. 11 (SH)

IV. Ergebnisse

6.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.30: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 11 (SH)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE n = 16		Positive Isolate in den Urin-PE n = 11		Positive Isolate insgesamt n = 27	
		[%]		[%]		[%]
Hly	n = 11	68,75	n = 6	54,55	n = 17	62,96
<i>hlyA</i>	n = 11	68,75	n = 6	54,55	n = 17	62,96
Pap/Prs	n = 2	12,50	n = 1	9,09	n = 3	11,11
<i>papA</i>	n = 14	87,50	n = 7	63,64	n = 21	77,78
<i>papC</i>	n = 13	81,25	n = 7	63,64	n = 20	74,07
<i>papEF</i>	n = 13	81,25	n = 7	63,64	n = 20	74,07
<i>papG</i> Allel I	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>papG</i> Allel III	n = 11	68,75	n = 6	54,55	n = 17	62,96
<i>Sfa</i>	n = 1	6,25	n = 0	0,00	n = 1	3,70
<i>sfa/focDE</i>	n = 11	68,75	n = 6	54,55	n = 17	62,96
Fim	n = 14	87,50	n = 9	81,82	n = 23	85,19
<i>fimH</i>	n = 16	100,00	n = 11	100,00	n = 27	100,00
K1	n = 5	31,25	n = 5	45,45	n = 10	37,04
<i>kpsMT II</i>	n = 16	100,00	n = 11	100,00	n = 27	100,00
<i>kpsMT III</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>fyuA</i>	n = 16	100,00	n = 11	100,00	n = 27	100,00
<i>iutA</i>	n = 5	31,25	n = 5	45,45	n = 10	37,04
PAI	n = 12	75,00	n = 7	63,64	n = 19	70,37
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 14	87,50	n = 10	90,91	n = 24	88,89
<i>bmaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>rfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.31: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 11 (SH)

Klone (Stuhl: n=5) (Urin: n=3)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT II</i>	<i>kpsMT III</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
11KL1	D	U	+	+	+	+		+		+		+	+	8
11KL1	D	S	+	+	+	+		+		+		+	+	8
11KL1	E	S	+	+	+	+		+		+		+	+	8
11KL2	D	S	+	+	+	+		+		+			+	7
11KL3	F	U		+		+	+	+		+	+	+		7
11KL3	F	S		+		+	+	+		+	+	+		7
11KL4	F	U				+	+	+		+	+		+	6
11KL4	F	S				+	+	+		+	+		+	6
11KL5 ^a	F	S				+	+	+		+	+		+	6

^a *papA*(+)

Tabelle IV.32: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 11 (SH)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 5	[%]	n = 3	[%]
<i>hly</i>	n = 2	40,00	n = 1	33,33
<i>pap</i>	n = 3	60,00	n = 2	66,67
<i>sfa/foc</i>	n = 2	40,00	n = 1	33,33
<i>fim</i>	n = 5	100,00	n = 3	100,00
K1	n = 3	60,00	n = 2	66,67
<i>kpsMT II</i>	n = 5	100,00	n = 3	100,00
<i>kpsMT III</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>fyuA</i>	n = 5	100,00	n = 3	100,00
<i>iutA</i>	n = 3	60,00	n = 2	66,67
PAI	n = 2	40,00	n = 2	66,67
<i>ibeA</i>	n = 4	80,00	n = 2	66,67

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.33: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhlklonen von Pat. 11 (SH)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=5)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
6	2 x	40,00	<i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i> (2 x)
7	2 x	40,00	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>ibeA</i> <i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI
8	1 x	20,00	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i>

Tabelle IV.34: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 11 (SH)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=3)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
6	1 x	33,33	<i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i>
7	1 x	33,33	<i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI
8	1 x	33,33	<i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT II</i> + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i>

6.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

Zur Abbildung IV.35:

Man kann aus der chronologischen Darstellung der Bandenmuster aus der Rep-PCR ersehen, wann ein und dasselbe Muster zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftaucht. Außerdem ist die Herkunft des Isolates bzw. der Isolatengruppe, die ein Bandenmuster bildet, aus Stuhl oder Urin zu erkennen. Zum Abnahmedatum G gibt es hier keine Ergebnisse, weil keine Isolate aus den Proben angezüchtet werden konnten. Dieses Diagramm zeigt z.B., daß das Bandenmuster 6 über den Zeitraum D bis F hinweg sowohl bei Stuhl- als auch bei Urinstämmen vorkommt. Zum Zeitpunkt C fanden sich beispielsweise drei unterschiedliche Rep-PCR-Muster in den Isolaten dieser Urinprobe.

Zur Abbildung IV.36:

Die chronologische Ordnung der unterschiedlichen Bandenmuster aus der Untersuchung mit PFGE zeigt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit dieser Methode untersuchten Isolate zueinander. Man erkennt persistierende Stämme und kann sie nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe unterscheiden. Zum Termin G gibt es analog zur vorhergehenden Abbildung keine Isolate, weil die Proben nicht anwuchsen. Dieses Diagramm zeigt zu den Daten D und F drei Stämme, die zum selben Zeitpunkt sowohl in der Stuhl- als auch in der Urinprobe vorkamen. Im

IV. Ergebnisse

Vergleich mit dem Verlauf der Rep-PCR-Muster fällt auf, daß zum Datum F doch keine Persistenz eines vorher nachgewiesenen Stammes besteht, was aufgrund der Ergebnisse aus dem Screeningtest anders zu vermuten gewesen war. Hier erbrachte erst die Untersuchung mit PFGE Klarheit.

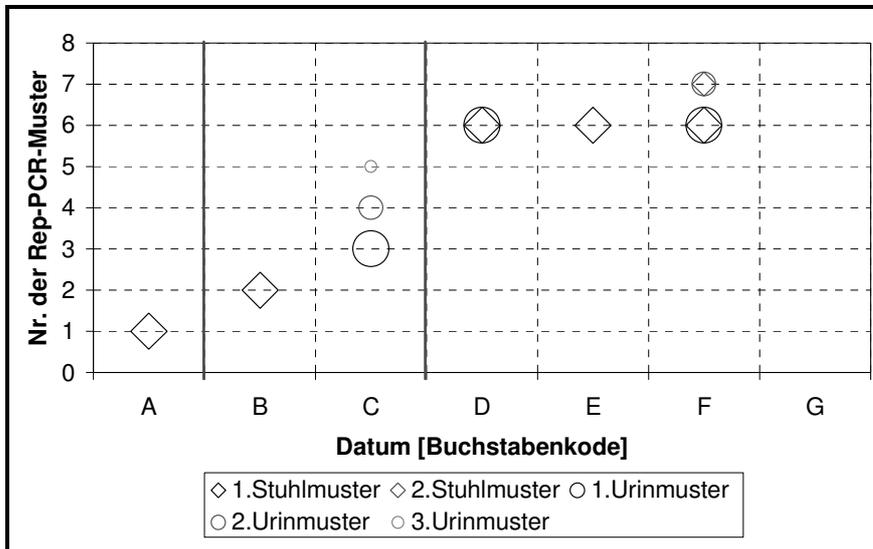


Abbildung IV.35: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 11 (SH)

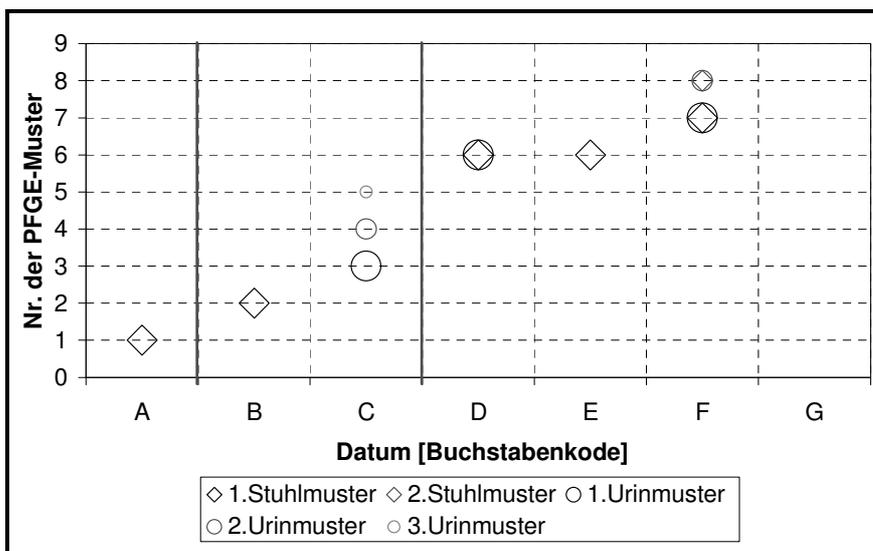


Abbildung IV.36: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 11 (SH)

Zur Abbildung IV.37:

Das Diagramm zeigt das chronologische Auftreten der definierten Klone im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Es sind die Rep-PCR- und die PFGE-Muster zusammen in einer Grafik dargestellt. Manche Klone kommen sowohl in Stuhl- wie auch in Urinproben vor und sind somit auf der Abszisse doppelt vertreten. Die Isolate der mit ^(a) indizierten Klone (Datum D und E) zeigen alle das PFGE-Muster VI. Das sind im einzelnen: 11D1U (^a11KL1), 11D1 (^a11KL1), 11E1 (^a11KL1) und 11D5 (^a11KL2).

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

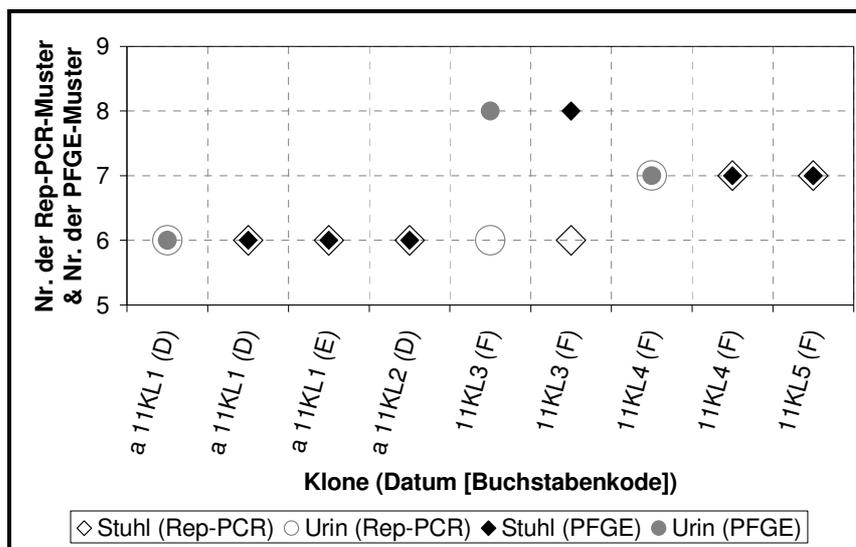


Abbildung IV.37: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 11 (SH)

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Zu den ersten beiden Abnahmedaten wurde für alle untersuchten Isolate das PFGE-Muster VI gefunden. Am 07.04.1999 wird eben dieses Bandenmuster auch bei den Isolaten **11D1U** (11KL1), **11D1** (11KL1) und **11D5** (11KL2, als Variante) detektiert und am 25.08.1999 zeigte sich das Muster bei dem Stuhlisolat **11E1** (11KL1). Die Gele 1 und 2 der Abbildung IV.38 verdeutlichen die Verwandtschaft der genannten Isolate. Für die Stuhlisolate mit dem PFGE-Muster VI wurde somit ein Überdauern von viereinhalb Monaten gezeigt.

Ab dem 15.12.1999 (F) ist das PFGE-Muster VI nicht mehr nachweisbar, jedoch können in Stuhl- und Urinisolaten dieses Untersuchungszeitpunktes je zwei gleiche Stämme nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um die Isolate **11F5U** und **11F1** (beide 11KL3), die ein gemeinsames *Xba*I-Restriktionsmuster (VIII) aufweisen, sowie um die Isolate **11F1U**, **11F2** (beide 11KL4) und die Variante **11F5** (11KL5), die alle das gleiche PFGE-Muster VII zeigen. In der Abbildung IV.38 zeigt das Gel 3 die Bandenmuster aller Isolate mit PFGE-Nummer VII und in Gel 4 ist das DNA-Bandenmuster Nummer VIII zu sehen.

➤ Fazit:

Bei Pat. 11 (SH) wird die Persistenz von Stuhlstämmen mit dem PFGE-Muster VI über die Dauer von vier Monaten bewiesen und es werden drei unterschiedliche Stämme gefunden, die innerhalb eines Untersuchungsdatums gleichzeitig in Stuhl und Urin vorkommen.

IV. Ergebnisse

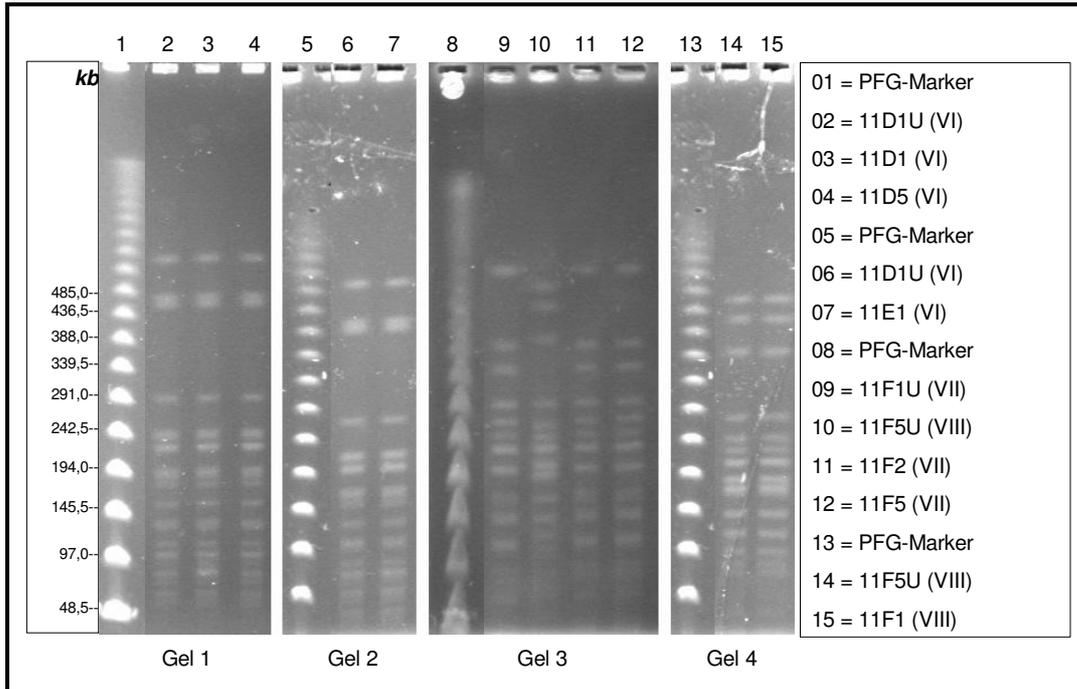


Abbildung IV.38: *XbaI*-Restriktionsmuster persistierender *E. coli* Stämme bei Pat. 11 (SH)

6.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Patientin 11 fühlte sich zu allen Untersuchungsterminen wohlauf. Die abgenommenen Urinkulturen waren durchweg unauffällig. Sie nahm dauerhaft Acimethin® zur Prophylaxe einer Harnwegsinfektion ein. Das folgende Diagramm zeigt die Parameter des Nephrologischen Labors für die Patientin im Zeitraum dieser Arbeit.

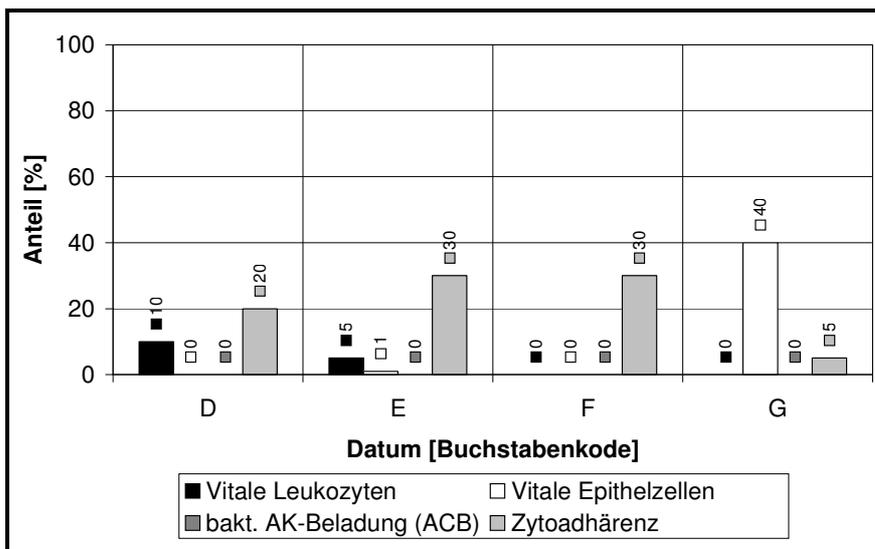


Abbildung IV.39: Nephrologisches Labor der Pat. 11 (SH)

Die Grafik zeigt einen unauffälligen Parameterstatus bei einer klinisch unauffälligen Patientin. Die Klinik und das Labor korrelieren hier sehr gut miteinander.

7. Patientin 22 (IH)

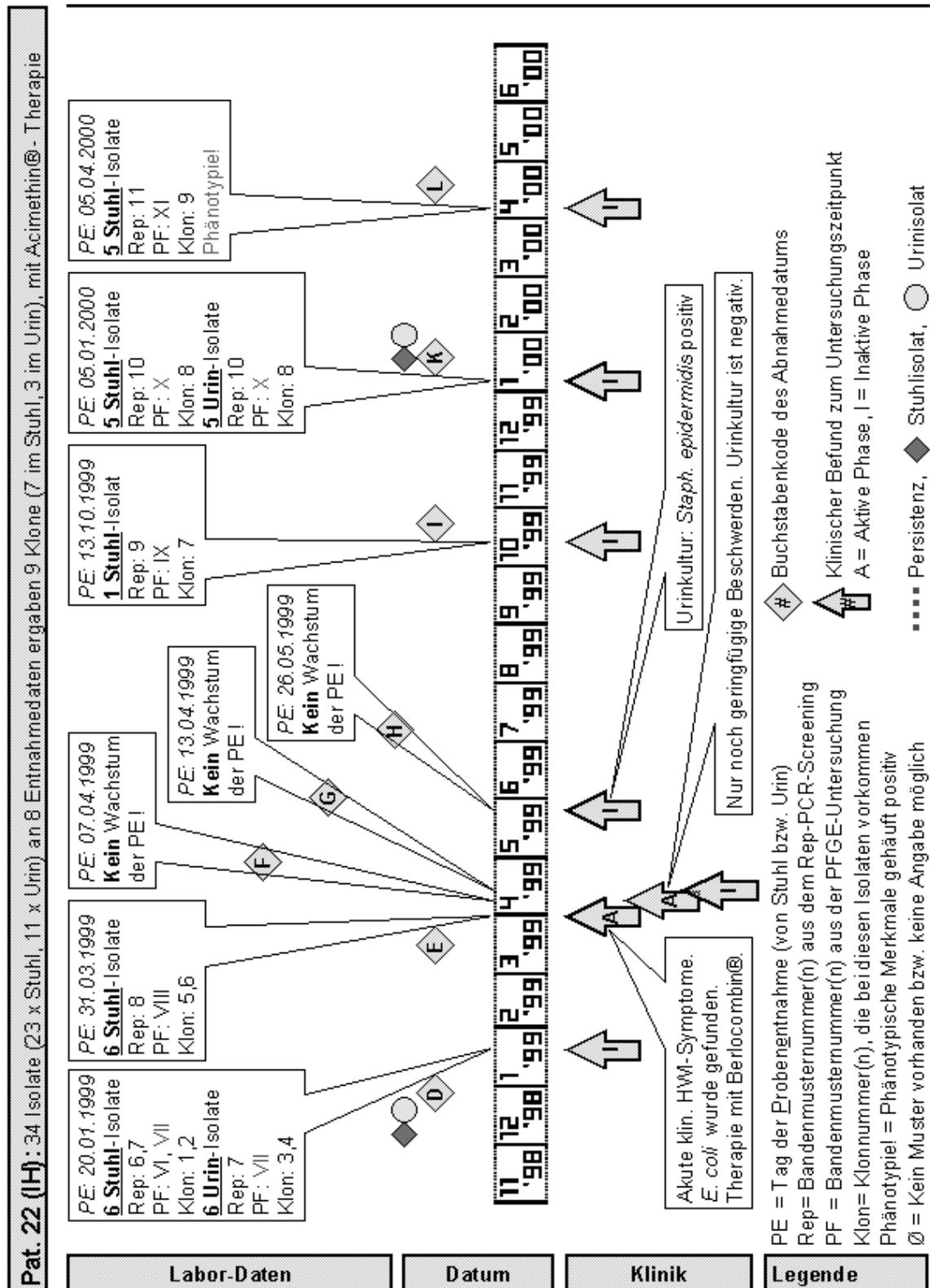


Abbildung IV.40: Verlauf der Untersuchungen bei Pat. 22 (IH)

IV. Ergebnisse

7.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.35: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 22 (IH)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE		Positive Isolate in den Urin-PE		Positive Isolate insgesamt	
	n = 23	[%]	n = 11	[%]	n = 34	[%]
Hly	n = 5	21,74	n = 0	0,00	n = 5	14,71
<i>hlyA</i>	n = 5	21,74	n = 0	0,00	n = 5	14,71
Pap/Prs	n = 10	43,48	n = 1	9,09	n = 11	32,35
<i>papA</i>	n = 13	56,52	n = 0	0,00	n = 13	38,24
<i>papC</i>	n = 11	47,83	n = 0	0,00	n = 11	32,35
<i>papEF</i>	n = 12	52,17	n = 5	45,45	n = 17	50,00
<i>papG</i> Allel I	n = 1	4,35	n = 6	54,55	n = 7	20,59
<i>papG</i> Allel III	n = 10	43,48	n = 0	0,00	n = 10	29,41
Sfa	n = 5	21,74	n = 0	0,00	n = 5	14,71
<i>sfa/focDE</i>	n = 5	21,74	n = 0	0,00	n = 5	14,71
Fim	n = 21	91,30	n = 5	45,45	n = 26	76,47
<i>fimH</i>	n = 21	91,30	n = 5	45,45	n = 26	76,47
K1	n = 10	43,48	n = 5	45,45	n = 15	44,12
<i>kpsMT</i> II	n = 16	69,57	n = 5	45,45	n = 21	61,76
<i>kpsMT</i> III	n = 1	4,35	n = 5	45,45	n = 6	17,65
<i>fyuA</i>	n = 23	100,00	n = 5	45,45	n = 28	82,35
<i>iutA</i>	n = 13	56,52	n = 11	100,00	n = 24	70,59
PAI	n = 10	43,48	n = 0	0,00	n = 10	29,41
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 15	65,22	n = 10	90,91	n = 25	73,53
<i>bmaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>rfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.36: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 22 (IH)

Klone (Stuhl: n=7) (Urin: n=3)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
22KL1	D	S		+		+		+		+		+	+	6
22KL2 ^a	D	S							+	+	+			3
22KL3 ^a	D	U							+		+		+	3
22KL4	D	U									+			1
22KL5 ^b	E	S				+				+	+			3
22KL6	E	S				+				+	+			3
22KL7 ^{ac}	I	S						+		+	+			3
22KL8	K	U				+	+	+		+	+		+	6
22KL8	K	S				+	+	+		+	+		+	6
22KL9	L	S	+	+	+	+	+	+		+		+	+	9

^a *papEF*(+) ^b *papA*(+) ^c *papC*(+)

Tabelle IV.37: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 22 (IH)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 7	[%]	n = 3	[%]
<i>hly</i>	n = 1	14,29	n = 0	0,00
<i>pap</i>	n = 2	28,57	n = 0	0,00
<i>sfa/foc</i>	n = 1	14,29	n = 0	0,00
<i>fim</i>	n = 5	71,43	n = 1	33,33
K1	n = 2	28,57	n = 1	33,33
<i>kpsMT II</i>	n = 4	57,14	n = 1	33,33
<i>kpsMT III</i>	n = 1	14,29	n = 1	33,33
<i>fyuA</i>	n = 7	100,00	n = 1	33,33
<i>iutA</i>	n = 5	71,43	n = 3	100,00
PAI	n = 2	28,57	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 3	42,86	n = 2	66,67

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.38: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhlklonen von Pat. 22 (IH)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=7)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
3	4 x	57,14	<i>kpsMT III + fyuA + iutA</i> <i>fim + fyuA + iutA</i> (2 x) <i>kpsMT II + fyuA + iutA</i>
6	2 x	28,57	<i>pap + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i> <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>
9	1 x	14,29	<i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>

Tabelle IV.39: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 22 (IH)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=3)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
1	1 x	33,33	<i>iutA</i>
3	1 x	33,33	<i>kpsMT III + iutA + ibeA</i>
6	1 x	33,33	<i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>

7.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

Zur Abbildung IV.41:

Man kann aus der chronologischen Darstellung der Bandenmuster aus der Rep-PCR ersehen, wann ein und dasselbe Muster zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftaucht. Außerdem ist die Herkunft des Isolates bzw. der Isolatengruppe, die ein Bandenmuster bildet, aus Stuhl oder Urin zu erkennen. Bei Pat. 22 (IH) konnte nur ein Muster zu unterschiedlichen Zeitpunkten entdeckt werden (Muster 2 zu den Daten A und B), dafür wurden jedoch öfter gleiche Muster bei Isolaten aus Urin- und gleichzeitig Stuhlproben gefunden: Muster 3 (Datum B), Muster 5 (Datum C) Muster 8 (Datum D) und Muster 10 (Datum K). Für den Zeitraum F bis H konnten keine Isolate aus den Proben gewonnen werden.

Zur Abbildung IV.42:

Die chronologische Ordnung der unterschiedlichen Bandenmuster aus der Untersuchung mit PFGE zeigt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit dieser Methode untersuchten Isolate zuein-

IV. Ergebnisse

ander. Man erkennt persistierende Stämme und kann sie nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe unterscheiden. Bei dieser Patientin gibt es eine völlige Übereinstimmung des Rep-PCR-Screeningtestes (s.o.) mit den Untersuchungen durch die PFGE. Patientin 22 bietet v.a. Stämme, die zum selben Untersuchungszeitpunkt sowohl aus Urin wie auch aus Stuhl isoliert wurden. Lediglich von Datum A auf B ist eine Persistenz über eine bestimmte Zeit hinweg zu erkennen. Aus den Proben, die von den Untersuchungsterminen F bis H eingeschendet wurden, ließen sich (wie bereits erwähnt) keine Isolate anzüchten.

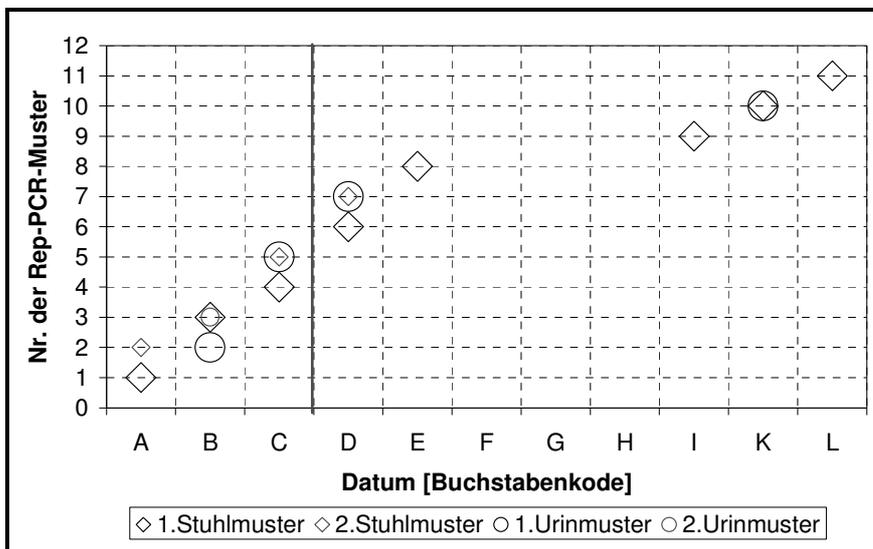


Abbildung IV.41: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 22 (IH)

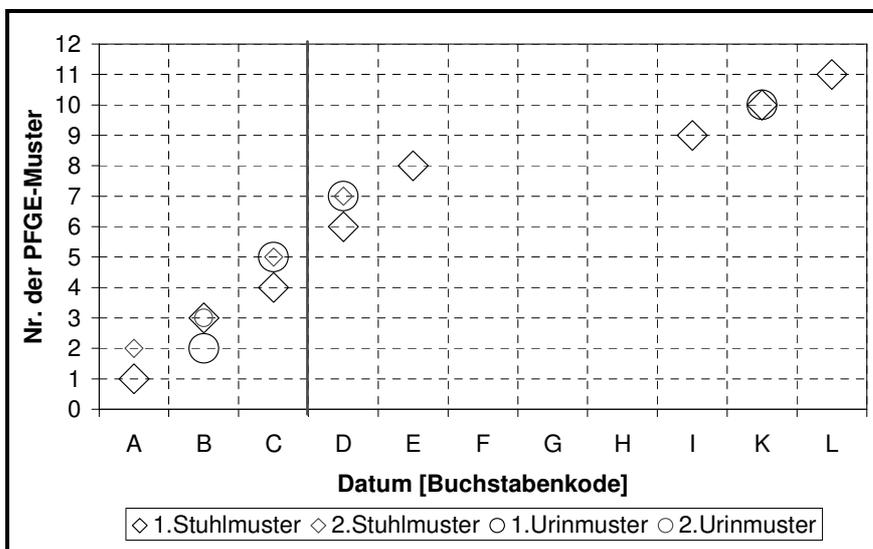


Abbildung IV.42: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 22 (IH)

Zur Abbildung IV.43:

Das Diagramm zeigt das chronologische Auftreten der definierten Klone im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Es sind sowohl Rep-PCR- wie auch PFGE-Bandenmuster in einem dargestellt, außerdem kommen manche Klone sowohl in Stuhl- wie auch in Urinproben vor und sind deshalb auf der Abszisse doppelt vertreten. Bei Klonen ohne ein PFGE-Bandenmuster wurde kein Isolat zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt. Die Varianten mit den Isolaten 22D4 (^a22KL2) und 22D1U (^a22KL3) zeigen beide zum Zeitpunkt D das PFGE-Muster VII. Die Isolate 22K1U (^b22KL8) und 22K1 (^b22KL8) zeigen beide das PFGE-Muster X.

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

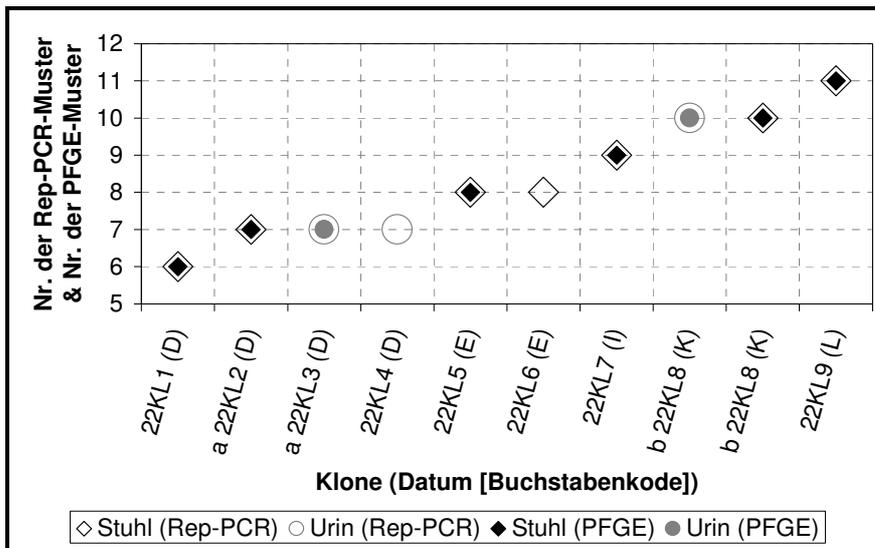


Abbildung IV.43: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 22 (IH)

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Bei der Pat. 22 (IH) lassen sich im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit keinerlei Persistenzen durch die Untersuchung mit der PFGE nachweisen. Es können jedoch zu zwei unterschiedlichen Entnahmedaten jeweils Stuhl- als auch Urinisolate nachgewiesen werden, die im PFGE-Muster übereinstimmen.

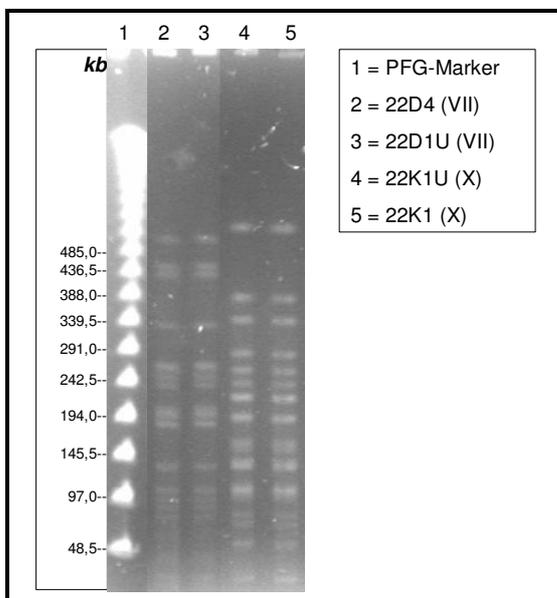


Abbildung IV.44: Stämme mit gleichem *Xba*I-Restriktionsenzym-Muster bei der Pat. 22 (IH)

Es handelt sich dabei um das Stuhlisolat **22D4** (22KL2) und das Urinisolat **22D1U** (22KL3) als Variante, die aus Proben vom 20.01.1999 isoliert wurden (Abb. IV.44,

Spuren 2 und 3, beide PFGE-Muster VII). Zur Untersuchung am 05.01.2000 sind für das Urinisolat **22K1U** und für das Stuhlisolat **22K1** (beide Klon 22KL8) ebenfalls gleiche PFGE-Muster (X) zu erkennen (Abb. IV.44, Spuren 4 und 5).

7.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Patientin 22 stellte sich zum Termin E mit akuter HWI-Symptomatik vor. Es konnte *E. coli* aus der Urinkultur gewonnen werden. Sie nahm fortan Berlocombin® für sechs Wochen ein und wurde dreimal engmaschig nachkontrolliert (F, G und H). Bis zur nächsten Untersuchung nach ca. einer Woche (Datum F) waren die Beschwerden bereits größtenteils wieder abgeklungen. In der restlichen Zeit des Untersuchungszeitraumes war sie unauffällig. In der Urinkultur zum Zeitpunkt H fand sich *Staphylococcus epidermidis*, der jedoch keine Beschwerden verursachte. Die Patientin war über den gesamten Studienzeitraum dieser Arbeit mit Acimethin® als Dauermedikation versorgt. Folgendes Diagramm zeigt den Verlauf wichtiger nephrologischer Parameter für den Beobachtungszeitraum.

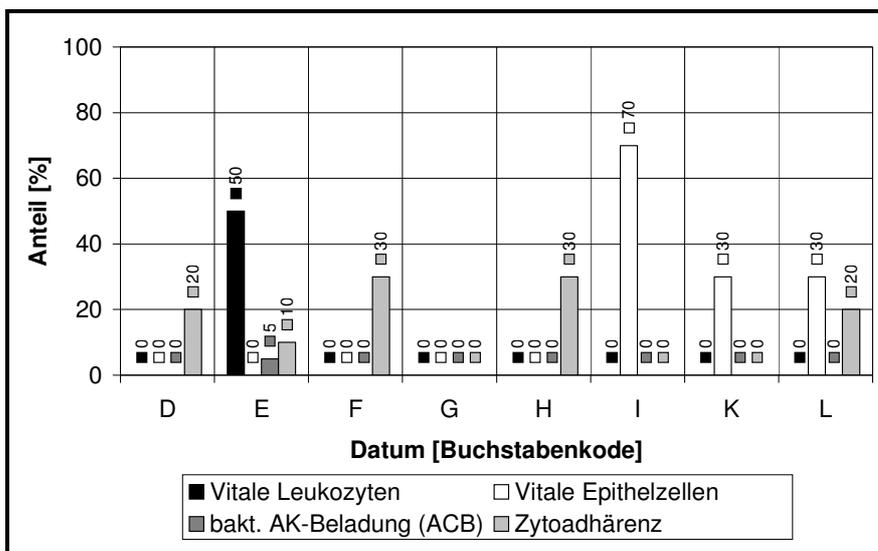


Abbildung IV.45: Nephrologisches Labor der Pat. 22 (IH)

Die Exazerbation der Harnwegsinfektion zum Zeitpunkt E bildet sich innerhalb der erhobenen Werte v.a. in einer Erhöhung der Leukozytenzahl ab. Die erhöhten Einzelwerte zu anderen Untersuchungsterminen müssen im wesentlichen auf die chronische Grunderkrankung zurückgeführt werden.

8. Patientin 29 (SJ)

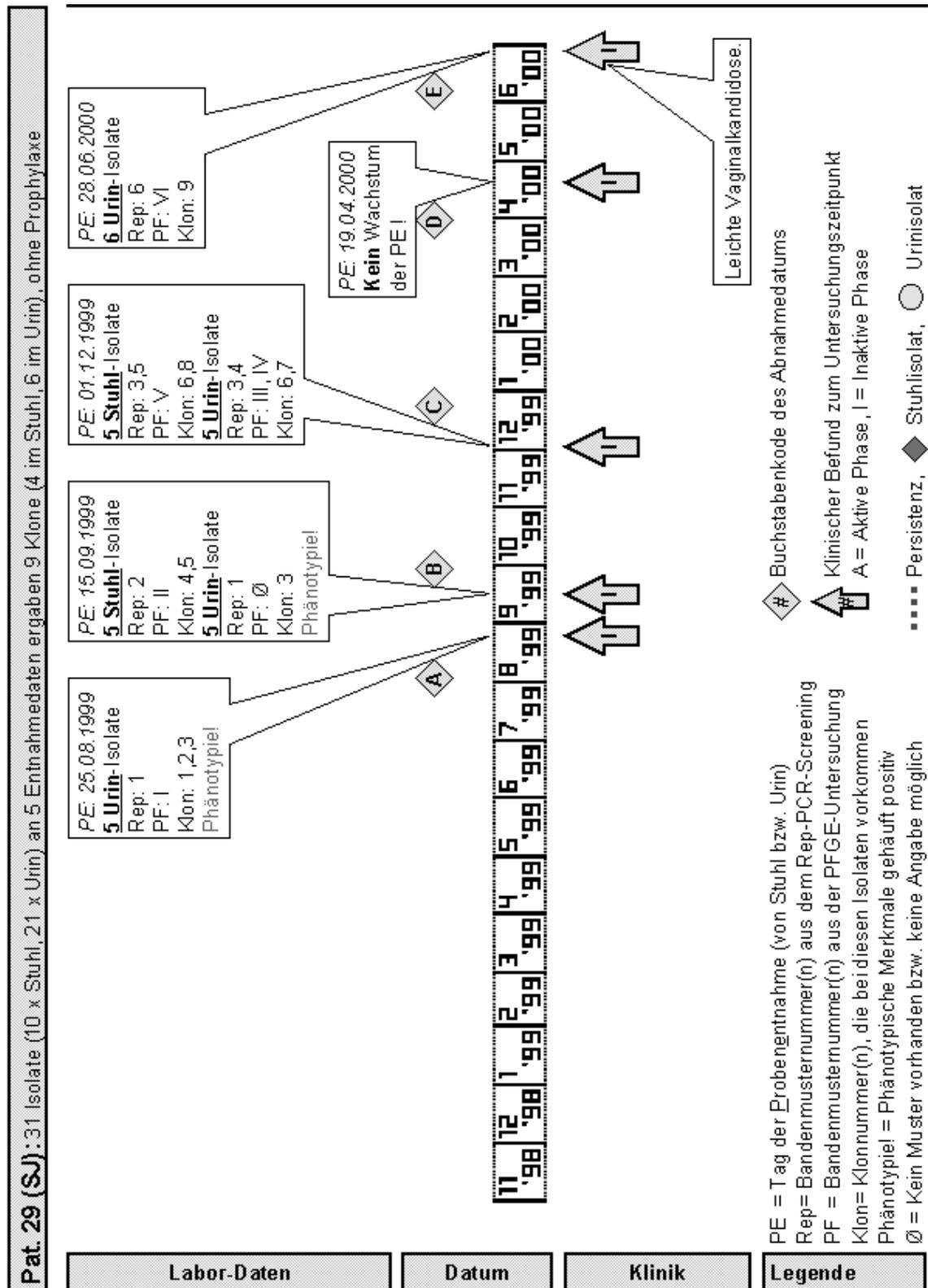


Abbildung IV.46: Verlauf der Untersuchungen bei Pat. 29 (SJ)

IV. Ergebnisse

8.1. Phänotypische und genotypische Ergebnisse

Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren innerhalb der Isolate

Tabelle IV.40: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten in den Isolaten von Pat. 29 (SJ)

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE		Positive Isolate in den Urin-PE		Positive Isolate insgesamt	
	n = 10	[%]	n = 21	[%]	n = 31	[%]
Hly	n = 0	0,00	n = 10	47,62	n = 10	32,26
<i>hlyA</i>	n = 0	0,00	n = 10	47,62	n = 10	32,26
Pap/Prs	n = 3	30,00	n = 8	38,10	n = 11	35,48
<i>papA</i>	n = 0	0,00	n = 10	47,62	n = 10	32,26
<i>papC</i>	n = 1	10,00	n = 10	47,62	n = 11	35,48
<i>papEF</i>	n = 6	60,00	n = 10	47,62	n = 16	51,61
<i>papG</i> Allel I	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>papG</i> Allel III	n = 0	0,00	n = 10	47,62	n = 10	32,26
<i>Sfa</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>sfa/focDE</i>	n = 5	50,00	n = 16	76,19	n = 21	67,74
Fim	n = 10	100,00	n = 16	76,19	n = 26	83,87
<i>fimH</i>	n = 10	100,00	n = 19	90,48	n = 29	93,55
K1	n = 5	50,00	n = 12	57,14	n = 17	54,84
<i>kpsMT</i> II	n = 5	50,00	n = 19	90,48	n = 24	77,42
<i>kpsMT</i> III	n = 5	50,00	n = 0	0,00	n = 5	16,13
<i>fyuA</i>	n = 5	50,00	n = 19	90,48	n = 24	77,42
<i>iutA</i>	n = 5	50,00	n = 9	42,86	n = 14	45,16
PAI	n = 1	10,00	n = 16	76,19	n = 17	54,84
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 8	80,00	n = 19	90,48	n = 27	87,10
<i>bmaE</i>	n = 0	0,00	n = 2	9,52	n = 2	6,45
<i>rfc</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00

Wichtige Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone und ihre Häufigkeiten

Tabelle IV.41: Wichtige Pathogenitätsfaktoren der Klone von Pat. 29 (SJ)

Klone (Stuhl: n=4) (Urin: n=6)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
29KL1	A	U	+	+	+	+	+	+		+		+	+	9
29KL2	A	U	+	+	+	+	+	+		+		+	+	9
29KL3	A	U	+	+	+	+		+		+		+	+	8
29KL3	B	U	+	+	+	+		+		+		+	+	8
29KL4 ^a	B	S			+	+			+				+	4
29KL5 ^a	B	S			+	+			+					3
29KL6	C	U				+	+	+		+	+		+	6
29KL6	C	S				+	+	+		+	+		+	6
29KL7	C	U												0
29KL8 ^{ab}	C	S				+	+	+		+	+	+		6
29KL9	E	U			+	+	+	+		+	+	+	+	8

^a *papEF*(+)

^b *papC*(+)

Tabelle IV.42: Faktorenhäufigkeiten innerhalb der definierten Klone von Pat. 29 (SJ)

PCR-getestete genotypische Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 4	[%]	n = 6	[%]
<i>hly</i>	n = 0	0,00	n = 3	50,00
<i>pap</i>	n = 0	0,00	n = 3	50,00
<i>sfa/foc</i>	n = 2	50,00	n = 4	66,67
<i>fim</i>	n = 4	100,00	n = 5	83,33
K1	n = 2	50,00	n = 4	66,67
<i>kpsMT II</i>	n = 2	50,00	n = 5	83,33
<i>kpsMT III</i>	n = 2	50,00	n = 0	0,00
<i>fyuA</i>	n = 2	50,00	n = 5	83,33
<i>iutA</i>	n = 2	50,00	n = 2	33,33
PAI	n = 1	25,00	n = 4	66,67
<i>ibeA</i>	n = 2	50,00	n = 5	83,33

Genkombinationen wichtiger Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Klone

Tabelle IV.43: Genkombinationen wichtiger PF in den Stuhklonen von Pat. 29 (SJ)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=4)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
3	1 x	25,00	<i>sfa/foc + fim + kpsMT III</i>
4	1 x	25,00	<i>sfa/foc + fim + kpsMT III + ibeA</i>
6	2 x	50,00	<i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i> <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>

Tabelle IV.44: Genkombinationen wichtiger PF in den Urinklonen von Pat. 29 (SJ)

Pos. PF	Klon- anzahl	in % (n=6)	Gen(e) bzw. Gencluster i.d. Kombination
0	1 x	16,67	
6	1 x	16,67	<i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>
8	2 x	33,33	<i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i> <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>
9	2 x	33,33	<i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA (2 x)</i>

8.2. Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse

Ergebnisse im gesamten Studienzeitraum bei Stuhl- und Urinisolaten

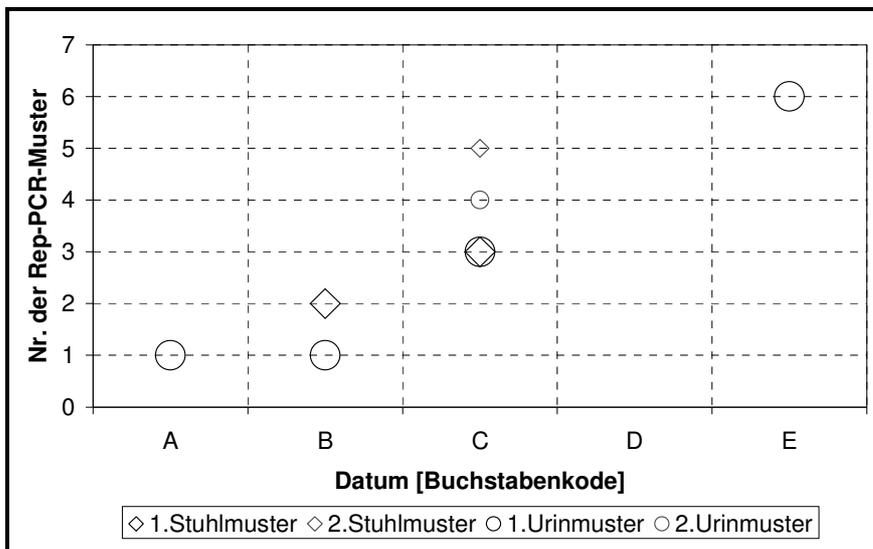


Abbildung IV.47: Rep-PCR-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 29 (SJ)

Man kann aus der zeitlichen Abfolge der Rep-PCR-Bandenmuster ersehen, wann ein Muster zu welchen Zeitpunkten auftaucht, auch ist die Herkunft des Isolates bzw. der Isolatengruppe, die ein Bandenmuster bildet, aus Stuhl oder Urin erkennbar. Bei dieser Patientin wurde das Muster 1 aus Urinisolaten zu zwei Zeitpunkten (A und B) nachgewiesen. Zur Untersuchung an Datum C fand sich das Rep-PCR-Muster 3 gleichzeitig in Isolaten aus Stuhl und Urin. Zum Zeitpunkt D gibt es keine Ergebnisse, weil keine Isolate aus den Proben angezchtet werden konnten.

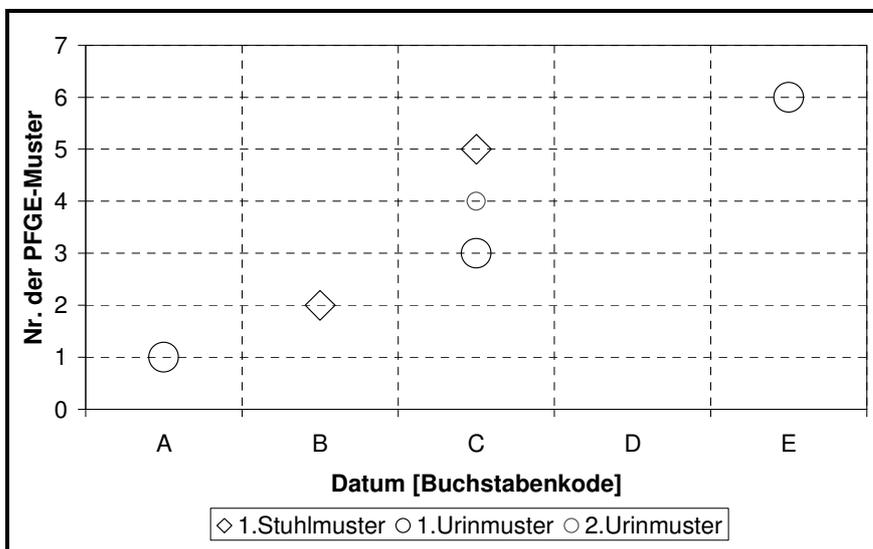


Abbildung IV.48: PFGE-Muster-Verlauf der gesamten Studie bei Pat. 29 (SJ)

Die chronologische Ordnung der unterschiedlichen Bandenmuster aus der Untersuchung mit PFGE zeigt die Verwandtschaftsbeziehung aller mit dieser Methode untersuchten Isolate zueinander. Man erkennt persistierende Stämme und kann sie nach ihrer Herkunft aus Stuhl- oder Urinprobe unterscheiden. Letztendlich ergaben sich bei Patientin 29 keine Beziehungen unter den ausgewählten Isolaten und es gab auch keine Koexistenz eines Stammes in einer Stuhl- und gleichzeitig in einer Urinprobe. Eine Persistenz wie sie noch durch das Rep-PCR-Screening

zu vermuten war, konnte durch die PFGE letztlich nicht bestätigt werden. Zum Zeitpunkt D konnten keine Isolate aus den Proben gewonnen werden.

Ergebnisse im Zeitraum dieser Arbeit bei Stuhl- und Urinklonen

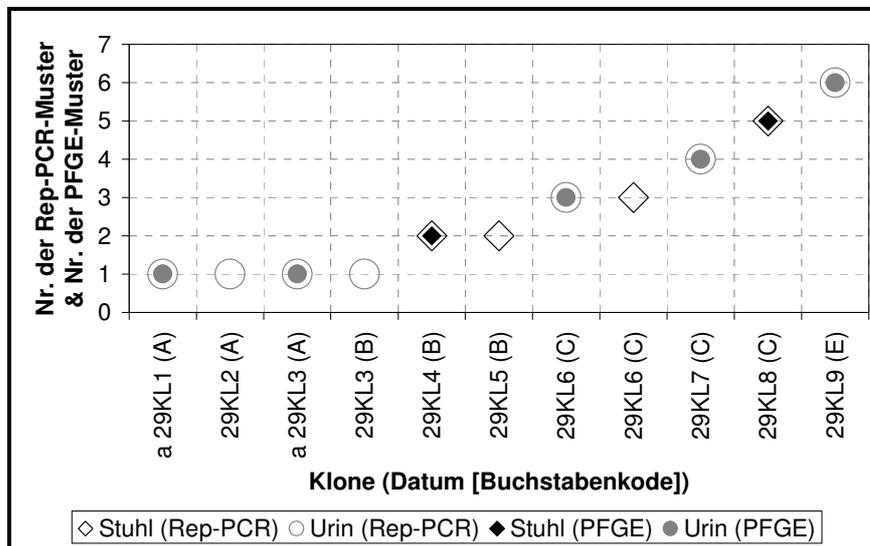


Abbildung IV.49: Rep-PCR- und PFGE-Muster nach Klonen geordnet - Verlauf bei Pat. 29 (SJ)

Die Grafik zeigt das chronologische Auftreten der definierten Klone im Beobachtungszeitraum dieser Arbeit. Sie integriert Rep-PCR- und PFGE-Muster. Manche Klone kommen sowohl in Stuhl- wie auch in Urinproben vor und sind deshalb auf der Abszisse doppelt vertreten. Bei Klonen ohne ein Bandenmuster wurde kein Isolat zur weiteren Untersuchung mit PFGE ausgewählt. Die Isolate der mit ^(a) indizierten Klone zeigen beide das PFGE-Muster I: 29A1U (^a29KL1) und 29A3U (^a29KL3)

Aussagen zur Erregerpersistenz im Zeitraum dieser Arbeit

Bei dieser Patientin ließen sich für den untersuchten Zeitraum keine Persistenzen nachweisen. In der Abbildung IV.50 sind die DNA-Bandenmuster, entstanden durch Verdauung mit *Xba*I-Restriktionsenzym, aller Isolate der Pat. 29 (SJ) dargestellt. Nur Isolat **29A1U** (Klon 29KL1) und als Variante Isolat **29A3U** (Klon 29KL3) zeigen je PFGE-Muster Nr. I. Das Isolat in Spur 6 dürfte kein *E. coli* Stamm sein.

IV. Ergebnisse

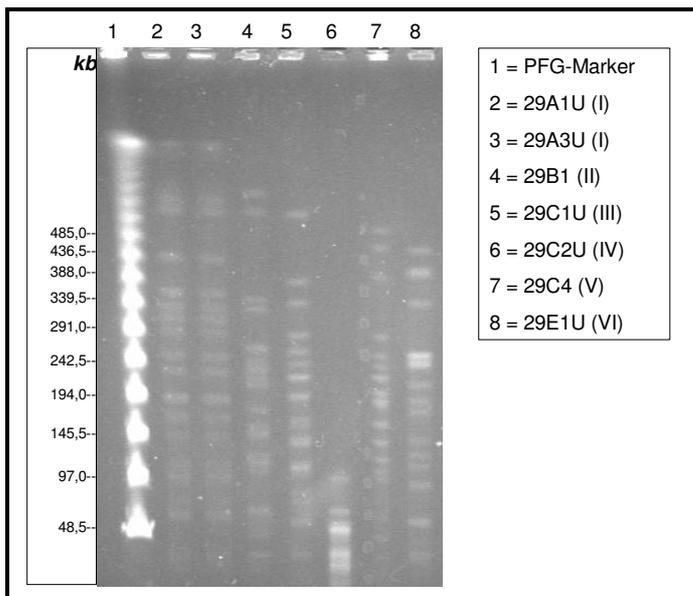


Abbildung IV.50: Alle PFGE-Muster von Pat. 29 (SJ)

8.3. Klinische Aktivität und klinisch-nephrologisches Labor

Während des Untersuchungszeitraumes dieser Arbeit fiel die Patientin 29 nicht auf. Alle Urinkulturen waren unverdächtig. Zum Zeitpunkt E wurde eine leichte Vaginalkandidose festgestellt. Die Patientin hatte über die gesamte Studienzeit Acimethin® als Dauermedikation. Das unten stehende Diagramm gibt Aufschluß über den Verlauf wichtiger nephrologischer Parameter dieser Patientin in der Beobachtungsphase.

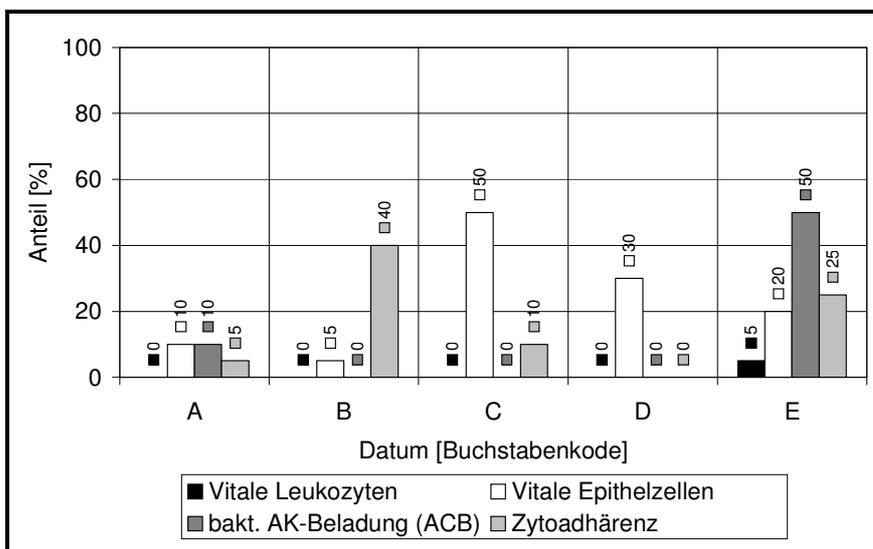


Abbildung IV.51: Nephrologisches Labor der Pat. 29 (SJ)

Die Grafik veranschaulicht einen weitgehend unauffälligen Parameterstatus bei subjektivem Wohlbefinden der Patientin. In wieweit die Vaginalkandidose die gemessenen Parameter beeinflusst bleibt unklar.

IV.C Auswertung patientenübergreifender Daten

1. Häufigkeiten phäno- und genotypischer Faktoren der Isolate

In der folgenden Tabelle sind die Häufigkeiten aller geno- und phänotypischer Faktoren für alle in dieser Arbeit untersuchten Isolate wiedergegeben. Diese Tabelle ist wie die entsprechenden Tabellen in den jeweiligen Patientenkapiteln aufgebaut. Die dazugehörige Abbildung veranschaulicht die prozentuale Häufigkeitsverteilung aller überprüften Pathogenitätsfaktoren grafisch. Jedes Merkmal wird mit seiner absoluten und relativen Gesamthäufigkeit sowie mit seiner Verteilung auf Stuhl- und Urinisolate dargestellt.

Tabelle IV.45: Phänotypische und genotypische Faktorenhäufigkeiten aller untersuchten Isolate

Getestete Faktoren	Positive Isolate in den Stuhl-PE		Positive Isolate in den Urin-PE		Positive Isolate insgesamt	
	n = 167	[%]	n = 186	[%]	n = 353	[%]
Hly	n = 43	25,75	n = 66	35,48	n = 109	30,88
<i>hlyA</i>	n = 43	25,75	n = 64	34,41	n = 107	30,31
Pap/Prs	n = 51	30,54	n = 67	36,02	n = 118	33,43
<i>papA</i>	n = 58	34,73	n = 80	43,01	n = 138	39,09
<i>papC</i>	n = 61	36,53	n = 73	39,25	n = 134	37,96
<i>papEF</i>	n = 76	45,51	n = 110	59,14	n = 186	52,69
<i>papG</i> Allel I	n = 1	0,60	n = 6	3,23	n = 7	1,98
<i>papG</i> Allel III	n = 48	28,74	n = 81	43,55	n = 129	36,54
Sfa	n = 18	10,78	n = 26	13,98	n = 44	12,46
<i>sfa/focDE</i>	n = 84	50,30	n = 100	53,76	n = 184	52,12
Fim	n = 131	78,44	n = 139	74,73	n = 270	76,49
<i>fimH</i>	n = 147	88,02	n = 157	84,41	n = 304	86,12
K1	n = 64	38,32	n = 88	47,31	n = 152	43,06
<i>kpsMT</i> II	n = 111	66,47	n = 118	63,44	n = 229	64,87
<i>kpsMT</i> III	n = 28	16,77	n = 50	26,88	n = 78	22,10
<i>fyuA</i>	n = 117	70,06	n = 130	69,89	n = 247	69,97
<i>iutA</i>	n = 107	64,07	n = 104	55,91	n = 211	59,77
PAI	n = 76	45,51	n = 89	47,85	n = 165	46,74
<i>nfaE</i>	n = 0	0,00	n = 0	0,00	n = 0	0,00
<i>ibeA</i>	n = 89	53,29	n = 89	47,85	n = 178	50,42
<i>bmaE</i>	n = 12	7,19	n = 24	12,90	n = 36	10,20
<i>rfc</i>	n = 5	2,99	n = 12	6,45	n = 17	4,82

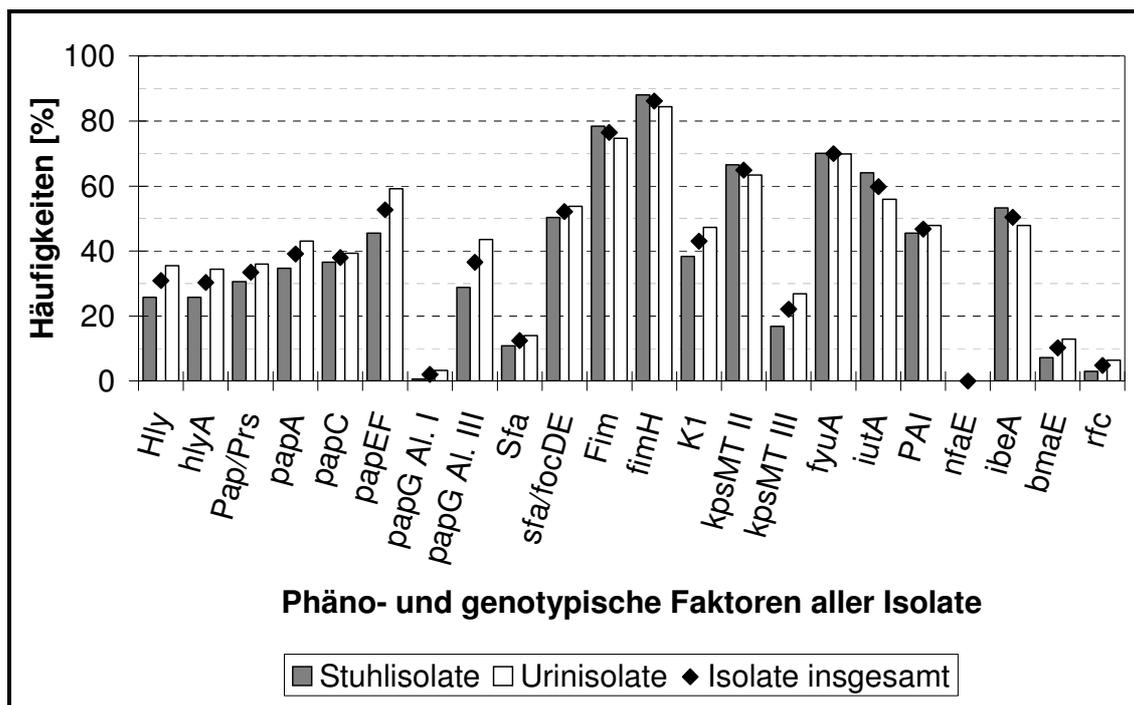


Abbildung IV.52: Phäno- und genotypische Faktorenhäufigkeiten innerhalb aller Isolate

Mit Ausnahme der Typ-1-Fimbrien werden alle phänotypischen Faktoren häufiger in den Urinisolaten exprimiert. Während alle *hlyA*-positiven Isolate auch eine phänotypische Reaktion zeigen, ist die phänotypische Expression der getesteten Adhäsine geringer im Vergleich zum Vorkommen der genetischen Anlage. Besonders die S-Fimbrien zeigen eine deutliche Diskrepanz. Die meisten genotypischen Faktoren sind häufiger innerhalb der Urinisolate zu finden. Ausnahmen hiervon sind das *fimH*-, das *kpsMT II*-, das *iutA*- und das *ibeA*-Gen. Das *fyuA*-Gencluster ist annähernd gleich verteilt und *nfaE* wurde zu keinem Zeitpunkt gefunden.

2. Häufigkeiten genotypischer Faktoren der Klone

Die folgende Zusammenstellung gibt die absoluten und relativen Faktorenhäufigkeiten innerhalb aller in dieser Arbeit definierten Klone wider. Das nachfolgende Balkendiagramm veranschaulicht diese Werte grafisch.

Tabelle IV.46: Genotypische Faktorenhäufigkeiten innerhalb aller Klone

Getestete Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE		Positive Klone in den Urin-PE	
	n = 81	[%]	n = 64	[%]
<i>hly</i>	n = 17	20,99	n = 20	31,25
<i>pap</i>	n = 19	23,46	n = 23	35,94
<i>sfa/foc</i>	n = 34	41,98	n = 33	51,56
<i>fim</i>	n = 64	79,01	n = 54	84,38
K1	n = 27	33,33	n = 36	56,25
<i>kpsMT II</i>	n = 47	58,02	n = 39	60,94
<i>kpsMT III</i>	n = 20	24,69	n = 15	23,44
<i>fyuA</i>	n = 48	59,26	n = 40	62,50
<i>iutA</i>	n = 51	62,96	n = 38	59,38
PAI	n = 27	33,33	n = 29	45,31
<i>ibeA</i>	n = 32	39,51	n = 26	40,63

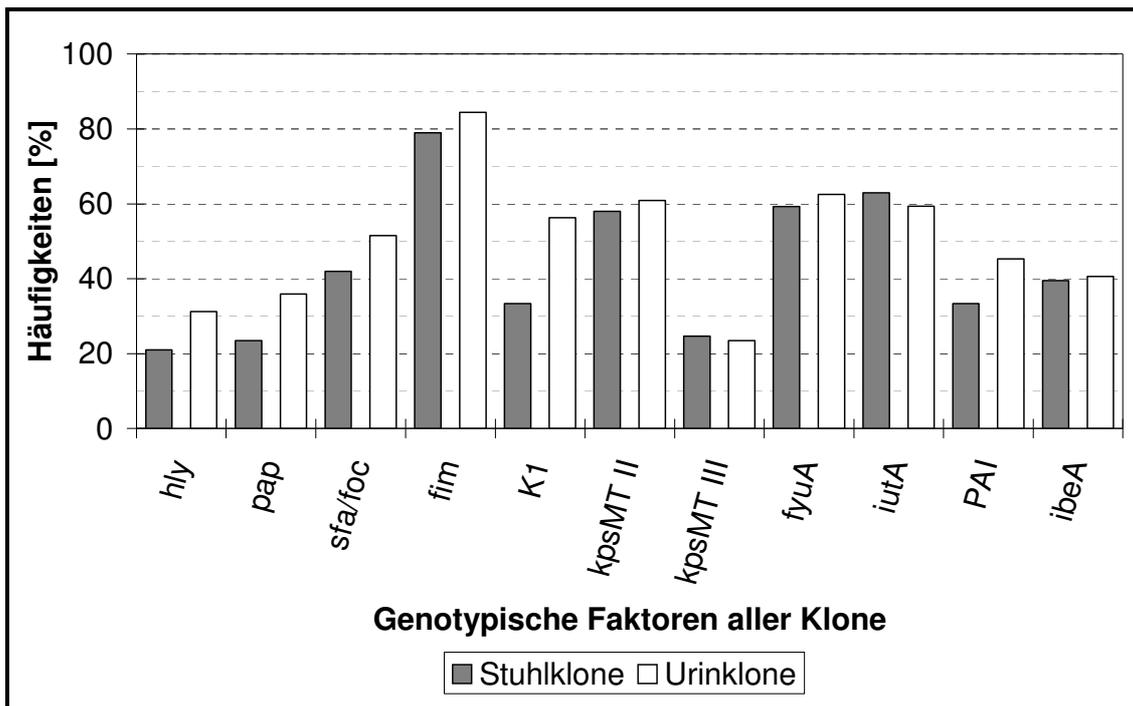


Abbildung IV.53: Häufigkeitsverteilung der Pathogenitätsfaktoren innerhalb der definierten Klone

Bis auf die Faktoren *iutA* und *kpsMT III* sind alle Pathogenitätsfaktoren innerhalb der Urinklone häufiger zu finden. Die Faktoren *hly*, *pap*, *sfa/foc*, K1 und PAI zeigen mit 10 % und mehr deutliche Unterschiede zwischen dem Vorkommen in Stuhl und Urin.

3. Genkombinationen innerhalb aller Klone nach ihrer Herkunft

Die zwei Tabellen dieses Kapitels zeigen alle in dieser Arbeit überhaupt vorkommenden Genkombinationen innerhalb der definierten Klone. Die Kombinationen sind unterteilt nach Stuhklonen (1. Tabelle mit 53 Kombinationen) und nach Urinklone (2. Tabelle mit 35 Kombinationen).

Die dritte Spalte gibt die Häufigkeiten (in %, n = absolute Anzahl der Klone) an, mit der verschiedene Genkombinationen mit derselben Anzahl an positiven Pathogenitäts-faktoren vorkommen, d.h. der Wert sagt aus, wieviele Klone in Bezug auf die Gesamtheit aller Klone genau diese Anzahl an positiven Merkmalen zeigen. Das Diagramm der Abbildung IV.54 stellt diese Prozentwerte für Stuhl- und Urinklone grafisch dar.

In der vierten Spalte steht eine laufende Nummer für die daneben stehende Genkombination. Alle vorkommenden Kombinationen sind eindeutig für Stuhl- und Urinklone durchnummeriert worden. Von den insgesamt 72 unterschiedlichen Kombinationen fanden sich 16 Kombinationen, die sowohl innerhalb der Stuhl- als auch innerhalb der Urinklone vorkamen. Solche gemeinsamen Kombinationen sind anhand ihrer laufenden Nummer farblich hervorgehoben.

IV. Ergebnisse

Tabelle IV.47: Genkombinationen wichtiger PF innerhalb aller Stuhlklone

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=81)	Laufende Nummer	Genkombinationen nach der Anzahl pos. PF 53 verschiedene Kombinationen innerhalb der 81 Stuhlklone. Davon kommen 16 Kombinationen auch bei den Urinklonen vor.	Anteil in %
0	3x	3,66	1.	1.	3,70
1	4x	4,94	2.	1. <i>sfa/foc</i>	1,23
			4.	2. <i>kpsMT II</i>	1,23
			5.	3. <i>fyuA</i>	1,23
			6.	4. <i>iutA</i>	1,23
2	11x	13,58	7.	1. <i>sfa/foc + fim</i>	1,23
			8.	2. <i>sfa/foc + kpsMT III</i>	1,23
			9.	3. <i>sfa/foc + ibeA (2x)</i>	2,46
			10.	4. <i>fim + kpsMT III (3x)</i>	3,70
			11.	5. <i>fim + fyuA</i>	1,23
			12.	6. <i>fim + iutA (3x)</i>	3,70
3	11x	13,58	15.	1. <i>hly + sfa/foc + fim</i>	1,23
			16.	2. <i>hly + sfa/foc + iutA (2x)</i>	2,46
			17.	3. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III</i>	1,23
			19.	4. <i>fim + kpsMT III + iutA (3x)</i>	3,70
			20.	5. <i>fim + fyuA + iutA (2x)</i>	2,46
			22.	6. <i>kpsMT II + fyuA + iutA</i>	1,23
			23.	7. <i>kpsMT III + fyuA + iutA</i>	1,23
4	10x	12,35	25.	1. <i>hly + sfa/foc + fim + iutA</i>	1,23
			27.	2. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III + iutA</i>	1,23
			28.	3. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III + ibeA</i>	1,23
			31.	4. <i>fim + kpsMT II + fyuA + ibeA (2x)</i>	2,46
			32.	5. <i>fim + kpsMT III + fyuA + iutA</i>	1,23
			33.	6. <i>fim + kpsMT III + iutA + ibeA</i>	1,23
			34.	7. <i>K1 + kpsMT II + iutA + ibeA (3x)</i>	3,70
5	7x	8,64	39.	1. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA</i>	1,23
			40.	2. <i>sfa/foc + fim + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,23
			41.	3. <i>sfa/foc + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA</i>	1,23
			42.	4. <i>fim + K1 + kpsMT II + iutA + ibeA</i>	1,23
			43.	5. <i>fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + ibeA (2x)</i>	2,46
			44.	6. <i>fim + kpsMT II + kpsMT III + iutA + PAI</i>	1,23
6	13x	16,04	46.	1. <i>hly + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + ibeA</i>	1,23
			48.	2. <i>pap + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,23
			49.	3. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA</i>	1,23
			50.	4. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,23
			51.	5. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (3x)</i>	3,70
			52.	6. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA (6x)</i>	7,41
7	7x	8,64	53.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + ibeA</i>	1,23
			54.	2. <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (3x)</i>	3,70
			55.	3. <i>pap + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	1,23
			56.	4. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>	1,23
			58.	5. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	1,23
8	10x	12,35	59.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI</i>	1,23
			61.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (3x)</i>	3,70
			62.	3. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,23
			63.	4. <i>hly + pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	1,23
			64.	5. <i>pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA + PAI</i>	1,23
			66.	6. <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	1,23
			67.	7. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA (2x)</i>	2,46
9	5x	6,17	68.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (2x)</i>	2,46
			69.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,23
			70.	3. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA + PAI</i>	1,23
			71.	4. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	1,23

Tabelle IV.48: Genkombinationen wichtiger PF innerhalb aller Urinklone

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=64)	Laufende Nummer	Genkombinationen nach der Anzahl pos. PF 35 verschiedene Kombinationen innerhalb der 64 Urinklone. Davon kommen 16 Kombinationen auch bei den Stuhlklonen vor.	Anteil in %
0	1x	1,56	1.	1.	1,56
1	4x	6,25	3. 6.	1. <i>fim</i> (2x) 2. <i>iutA</i> (2x)	3,13 3,13
2	7x	10,94	10. 11. 12. 13. 14.	1. <i>fim</i> + <i>kpsMT</i> III (3x) 2. <i>fim</i> + <i>fyuA</i> 3. <i>fim</i> + <i>iutA</i> 4. K1 + <i>kpsMT</i> II 5. <i>kpsMT</i> III + <i>iutA</i>	4,69 1,56 1,56 1,56 1,56
3	6x	9,38	18. 19. 21. 24.	1. <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>iutA</i> (2x) 2. <i>fim</i> + <i>kpsMT</i> III + <i>iutA</i> (2x) 3. <i>kpsMT</i> II + <i>kpsMT</i> III + <i>fyuA</i> 4. <i>kpsMT</i> III + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i>	3,13 3,13 1,56 1,56
4	6x	9,38	26. 27. 29. 30.	1. <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT</i> III + <i>fyuA</i> 2. <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT</i> III + <i>iutA</i> (2x) 3. <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> III + <i>fyuA</i> 4. <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> III + <i>iutA</i> (2x)	1,56 3,13 1,56 3,13
5	5x	7,81	35. 36. 37. 38. 41.	1. <i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>fyuA</i> + PAI 2. <i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>ibeA</i> 3. <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> 4. <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> III + <i>iutA</i> 5. <i>sfa/foc</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i>	1,56 1,56 1,56 1,56 1,56
6	9x	14,06	45. 47. 52.	1. <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>fyuA</i> + PAI 2. <i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + PAI + <i>ibeA</i> 3. <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + <i>ibeA</i> (7x)	1,56 1,56 10,94
7	6x	9,38	54. 57.	1. <i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI (4x) 2. <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (2x)	6,25 3,13
8	11x	17,19	60. 61. 62. 65. 66. 67.	1. <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + PAI + <i>ibeA</i> 2. <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI (3x) 3. <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (3x) 4. <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI 5. <i>pap</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i> 6. <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (2x)	1,56 4,69 4,69 1,56 1,56 3,13
9	6x	9,38	68. 69.	1. <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI (2x) 2. <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (4x)	3,13 6,25
10	3x	4,69	72.	1. <i>hly</i> + <i>pap</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + K1 + <i>kpsMT</i> II + <i>fyuA</i> + <i>iutA</i> + PAI + <i>ibeA</i> (3x)	4,69

Eine Kombination von Genen und Genclustern aus der Gruppe der Kombinationen mit fünf Pathogenitätsfaktoren pro Urinklon (laufende Nummer 52) ragt mit einem Vorkommen von 10,94 % besonders heraus. Zwei weitere Genkombinationen (laufende Nummern 54 und 69), die jeweils einen Anteil von 6,25 % ausmachen, sind ebenfalls auffällig häufig. Die Kombinationen sind durch farbliche Markierung der Prozentzahlen in der jeweils letzten Spalte der Tabelle hervorgehoben.

Bei den Klonen mit Vorkommen in Stuhlisolaten gibt es nur eine auffallend häufige Genkombination, die farblich markiert ist (Nummer 52 mit 7,41 %). Es ist die gleiche Kombination wie sie innerhalb der Urinklone am häufigsten vorkommt (ebenfalls Nr. 52). Die beteiligten Pathogenitätsfaktoren sind *fim*, K1, *kpsMT* II, *fyuA*, *iutA* und *ibeA*.

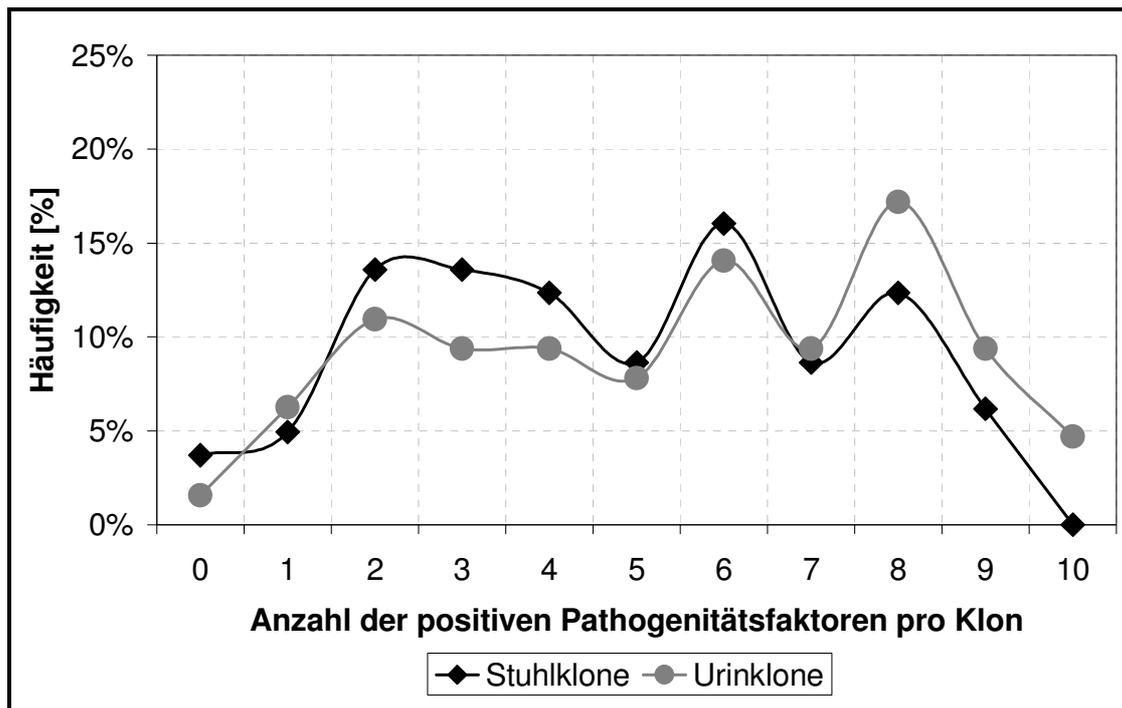


Abbildung IV.54: Stuhl- und Urinklone nach der Anzahl ihrer Pathogenitätsfaktoren

Die Grafik zeigt getrennt nach Stuhl- und Urinklone die Häufigkeitsverteilung aller Genkombinationen. Eine Genkombination meint hier das Auftreten einer bestimmten Zahl positiver Pathogenitätsfaktoren innerhalb aller Klone. Aus den beiden vorhergehenden Tabellen sind für dieses Diagramm jeweils die ersten Spalten („Pos. PF“) für die Abszisse und jeweils die dritten Spalten („Häufigkeit in %“) für die Ordinate verwendet worden. Die beiden Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf mit der Tendenz, daß Genkombinationen mit wenigen positiven Pathogenitätsfaktoren vermehrt innerhalb von Stuhklonen zu finden sind, während Genkombinationen mit vielen positiven Pathogenitätsfaktoren häufiger innerhalb der Urinklone auftauchen.

Die letzte Spalte einer jeden Tabelle zeigt die Häufigkeit, mit der jede einzelne Genkombination (unterteilt nach Stuhl- und Urinklone) in Bezug auf die Gesamtheit aller Kombinationen überhaupt vorkommt. In Abbildung IV.55 entsprechen die Balken (Gesamthöhe) in der linken und rechten Hälfte des Diagramms jeweils den Maxima des Liniendiagramms aus der Abbildung IV.54. Ein Unterschied zur ersten Grafik besteht darin, daß die Häufigkeiten der Klone mit einer bestimmten Anzahl an PF nicht zusammen, sondern nebeneinander dargestellt sind. Ein zweiter Unterschied ist, daß aus Abbildung IV.55 der Anteil jeder einzelnen überhaupt vorkommenden Genkombination als Teilstapel eines Balkens ablesbar ist. Es können also insgesamt 86 Balkenabschnitte bzw. Genkombinationen (=52+34) gezählt werden (ohne die Klone mit *keinem* PF).

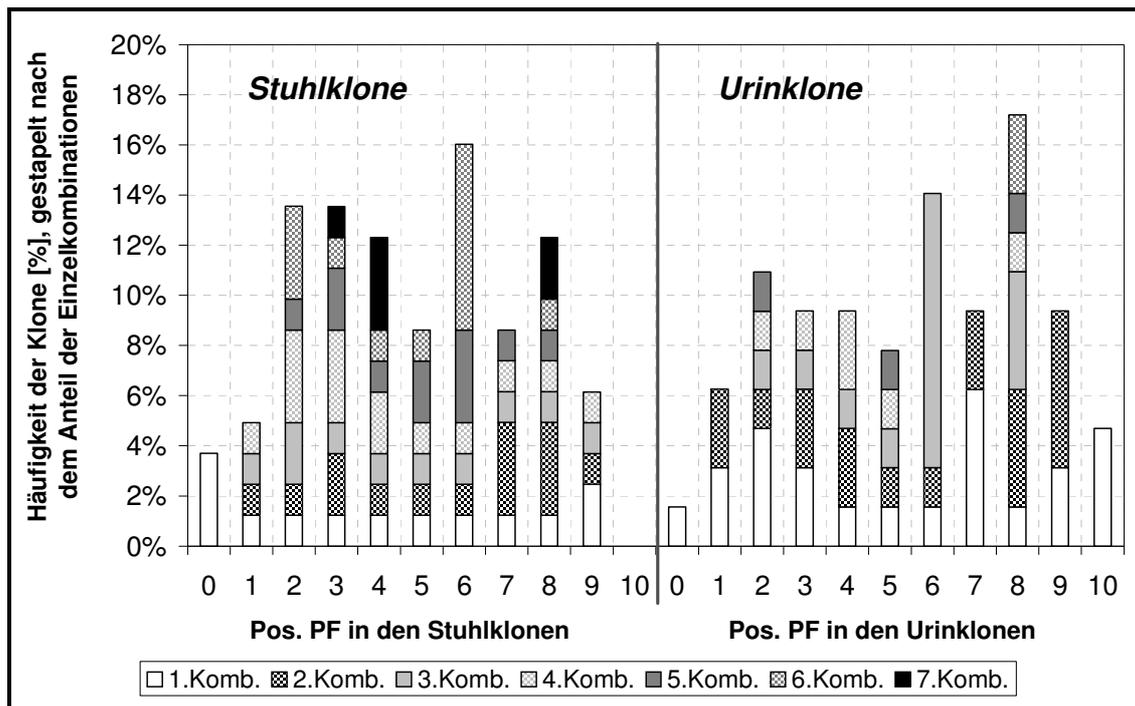


Abbildung IV.55: Häufigkeit jeder einzelnen, vorkommenden Genkombination (86 Komb.)

Dieses Diagramm zeigt noch einmal wie schon die vorhergehende Abbildung dieses Kapitels die Häufigkeitsverteilung der Genkombinationen nach der Anzahl der positiven Pathogenitätsfaktoren einer Kombination, unterschieden nach Stuhl- und Urinklone. Im Gegensatz zur vorherigen Grafik wird durch die Stapelung der Balken jede einzelne überhaupt vorkommende Genkombination erkennbar. Kurz: Jedes Stapelblöckchen repräsentiert die Häufigkeit exakt einer vorkommenden Genkombination. Beispiel: Von den abgebildeten 86 Kombinationen (16 davon sind Stuhl- und Urinklone gemeinsam) entspricht der oberste Balkenanteil aus allen Kombinationen mit genau sechs Pathogenitätsfaktoren auf der Seite der Urinklone der Genkombination Nr. 52 mit einem Vorkommen von 10,94 % (siehe Tab.).

4. Klone während klinisch aktiver Phasen

Nur zwei der acht Patientinnen hatten überhaupt akute Krankheitsschübe innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Es waren dies Pat. 8 (US) zum 12.05.1999 (K) und zum 19.01.2000 (N) und Pat. 22 (IH) zum 31.03.1999 (E) und zum 07.04.1999 (F); beides Patientinnen, die unter einer prophylaktischen Therapie mit Acimethin® (= L-Methionin) standen. An nur einem dieser vier Untersuchungsdaten konnten aus der Urinprobe auch Isolate angezüchtet werden, an einem Untersuchungstag konnten nicht einmal Isolate aus der Stuhlprobe gewonnen werden. Bemerkenswert sind die Klone von Pat. 8 (US) am 19.01.2000 (N) jedoch trotzdem, da sie nach den Ergebnissen aus der Pulsfeldgelelektrophorese alle ein und denselben Stamm darstellen, sowohl in der Stuhl- wie auch in der Urinprobe, wo der Stamm auch noch zu den beiden folgenden Untersuchungsdaten gefunden wird. Folgende Tabelle stellt alle Klone während einer

IV. Ergebnisse

als aktiv zu bezeichnenden Phase zusammen und gibt in den letzten Zeilen ihre Häufigkeiten in Prozent an, unterteilt nach dem Vorkommen der Klone.

Tabelle IV.49: Klone während aktiver Krankheitsphasen von Pat. 8 (US) und Pat. 22 (IH)

Klone (Stuhl: n=8) (Urin: n=3)	Datum [Buchstabencode]	Herkunft aus ... (S=Stuhl, U=Urin)	<i>hly</i>	<i>pap</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	K1	<i>kpsMT II</i>	<i>kpsMT III</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ibeA</i>	Anzahl pos. PF
8KL5	K	S				+					+			2
8KL20	N	U	+		+		+	+				+	+	6
8KL21	N	U	+	+	+	+	+	+				+	+	8
8KL22	N	U	+		+		+	+					+	5
8KL23	N	S					+	+			+		+	4
8KL24	N	S				+	+	+			+		+	5
8KL26	N	S	+		+	+	+	+					+	6
8KL27	N	S					+	+			+		+	4
8KL28	N	S					+	+			+		+	4
22KL5	E	S				+				+	+			3
22KL6	E	S				+				+	+			3
Häufigkeit des PF innerhalb der Stuhklone [%]			12,5	0	12,5	62,5	62,5	62,5	0	25,0	87,5	0	62,5	
Häufigkeit des PF innerhalb der Urinklone [%]			100	33,3	100	33,3	100	100	0	0	0	66,6	100	

5. Pathogenitätsfaktoren und Genkombinationen innerhalb der Klone bei Patientinnen mit und ohne Acimethin®-Therapie

Von den acht in dieser Arbeit beobachteten Patientinnen nahmen vier, nämlich Pat. 2 (HF), Pat. 3 (CG), Pat. 8 (US) und Pat. 22 (IH), dauerhaft das Medikament Acimethin® ein. Es handelt sich hierbei um die Aminosäure L-Methionin, die eine Absenkung des Urin-pH-Wertes (um ca. 2,0) bewirkt. Sie erhöht die renale Exkretion von Kalium, Magnesium, Citrat und Harnsäure und beugt Infektsteinen vor (Jarrar et al., 1996). Das Pharmakon wird v.a. zur Prophylaxe einer HWI eingesetzt.

Im Folgenden werden die Patientinnen mit einer dauerhaften Acimethin®-Therapie denen ohne eine solche prophylaktische Gabe gegenübergestellt. Die Werte sind tabellarisch zusammengetragen und grafisch veranschaulicht. Das Diagramm zeigt in der linken Hälfte (abgetrennt durch den Strich) die Situation bei den Klone in Stuhlproben und in der rechten Hälfte bei den Klone in Urinproben.

Tabelle IV.50: Klonale Häufigkeiten der PF unterteilt nach Therapie mit und ohne Acimethin®

Faktoren	Positive Klone in den Stuhl-PE unter Acimethin® Therapie		Positive Klone in den Stuhl-PE ohne Acimethin® Prophylaxe		Positive Klone in den Urin-PE unter Acimethin® Therapie		Positive Klone in den Urin-PE ohne Acimethin® Prophylaxe	
	n	[%]	n	[%]	n	[%]	n	[%]
<i>hly</i>	n = 12	23,08	n = 5	17,24	n = 11	28,21	n = 9	36,00
<i>pap</i>	n = 9	17,31	n = 10	34,48	n = 12	30,77	n = 11	44,00
<i>sfa/foc</i>	n = 18	34,62	n = 16	55,17	n = 19	48,72	n = 14	56,00
<i>fim</i>	n = 40	76,92	n = 24	82,76	n = 30	76,92	n = 24	96,00
K1	n = 16	30,77	n = 11	37,93	n = 18	46,15	n = 18	72,00
<i>kpsMT II</i>	n = 26	50,00	n = 21	72,41	n = 19	48,72	n = 20	80,00
<i>kpsMT III</i>	n = 14	26,92	n = 6	20,69	n = 12	30,77	n = 3	12,00
<i>fyuA</i>	n = 26	50,00	n = 22	75,86	n = 20	51,28	n = 20	80,00
<i>iutA</i>	n = 32	61,54	n = 19	65,52	n = 23	58,97	n = 15	60,00
PAI	n = 14	26,92	n = 13	44,83	n = 15	38,46	n = 14	56,00
<i>ibeA</i>	n = 17	32,69	n = 15	51,72	n = 12	30,77	n = 14	56,00

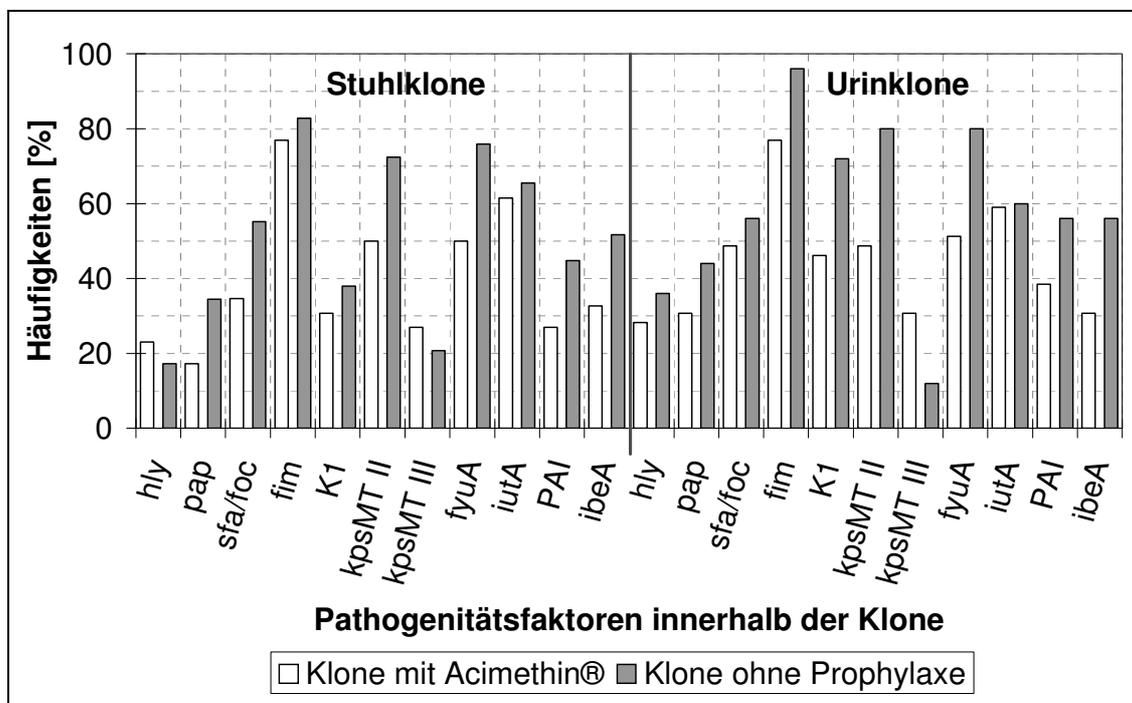


Abbildung IV.56: Klonale Häufigkeiten der PF unterteilt nach Therapie mit und ohne Acimethin®

Mit Ausnahme des Pathogenitätsfaktors *kpsMT III* (in Stuhl und Urin) und des *hly*-Genclusters innerhalb der Stuhklone ist das Vorkommen aller anderen PF unter einer Therapie mit Acimethin® z.T. deutlich geringer als ohne Therapie. Vergleicht man die relativen Häufigkeiten zwischen Stuhl- und Urinklonen unter Acimethin®-Therapie sowie zwischen Stuhl- und Urinklonen ohne prophylaktische Therapie, erkennt man für die Pathogenitätsfaktoren *hly*, *pap*, *sfa/foc*, *fim*, K1, *fyuA* und PAI ein z.T. deutlich höheres Vorhandensein innerhalb der Urinklone. Das *iut*-Gencluster ist innerhalb der Stuhklone häufiger. Die Faktoren *kpsMT II* und III sowie *ibeA* zeigen keine einheitlichen Tendenzen.

Wie alle vorkommenden Genkombinationen innerhalb von Stuhl- und Urinklonen gegenübergestellt wurden, so wird im Folgenden diese Gegenüberstellung nochmals nach Patientinnen mit und ohne prophylaktische Acimethin®-Therapie aufgeschlüsselt.

IV. Ergebnisse

Die anschließende Grafik ist analog der Abbildung IV.54 erstellt und zeigt die Klone nach ihrem Vorkommen in Stuhl oder Urin und nach den Therapieformen aufgliedert. Die zugrunde liegenden tabellarischen Zusammenstellungen der Genkombinationen sind vollständigshalber nach dem Diagramm angefügt.

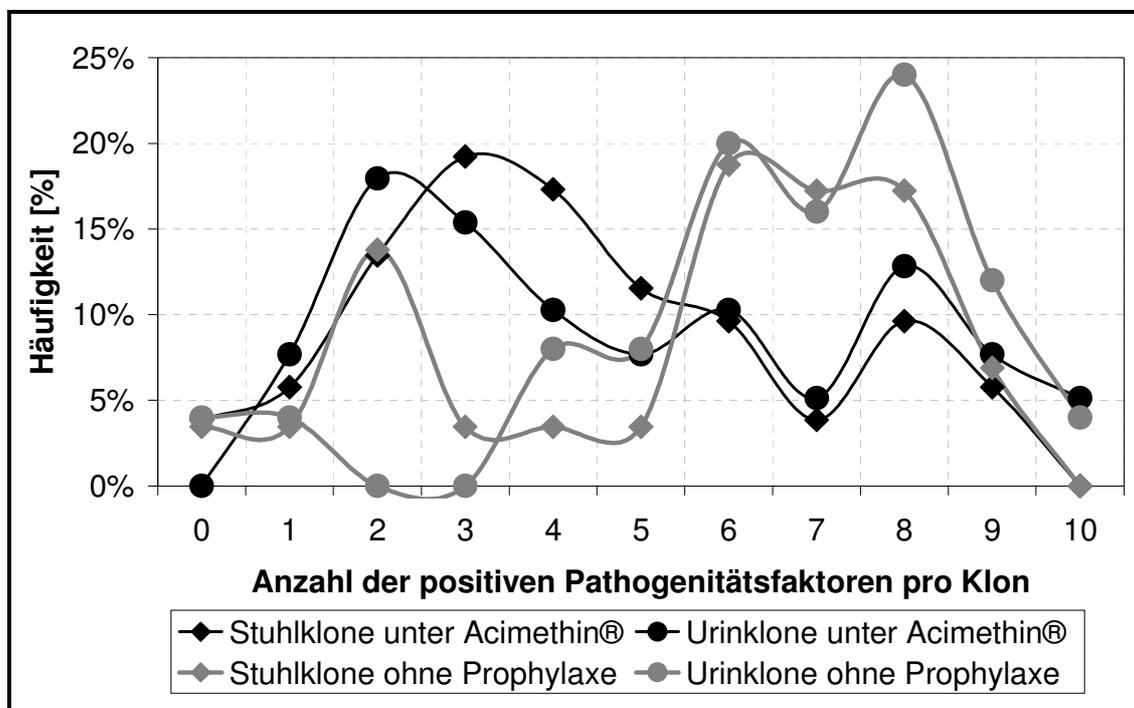


Abbildung IV.57: Klone nach Anzahl ihrer PF und nach Therapie mit und ohne Acimethin®

Auch in einer Unterscheidung nach Klonen mit und ohne eine Acimethin®-Therapie nehmen die Kurven einen ähnlichen Verlauf, d.h. die Grafen von Stuhl- und Urinklonen bleiben relativ nahe beieinander. Während jedoch die Häufigkeiten der Genkombinationen mit ansteigender Anzahl an Pathogenitätsfaktoren unter einer Acimethin®-Therapie eher abnimmt, steigen die Werte ohne prophylaktische Acimethin®-Gabe tendenziell an.

Tabelle IV.51: Genkombinationen in den Stuhlklonen der Patienten mit Acimethin® - Therapie

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=52)	Laufende Nummer	Genkombinationen nach der Anzahl pos. PF Pat. 2 (HF), Pat. 3 (CG), Pat. 8 (US) und Pat. 22 (IH)	Anteil in %
0	2x	3,85	1.	1.	
1	3x	5,77	2.	1. <i>sfa/foc</i>	1,92
			4.	2. <i>kpsMT II</i>	1,92
			6.	3. <i>iutA</i>	1,92
2	7x	13,46	7.	1. <i>sfa/foc + fim</i>	1,92
			10.	2. <i>fim + kpsMT III (3x)</i>	5,77
			11.	3. <i>fim + fyuA</i>	1,92
			12.	4. <i>fim + iutA (2x)</i>	3,85
3	10x	19,23	15.	1. <i>hly + sfa/foc + fim</i>	1,92
			16.	2. <i>hly + sfa/foc + iutA (2x)</i>	3,85
			19.	3. <i>fim + kpsMT III + iutA (3x)</i>	5,77
			20.	4. <i>fim + fyuA + iutA (2x)</i>	3,85
			22.	5. <i>kpsMT II + fyuA + iutA</i>	1,92
			23.	6. <i>kpsMT III + fyuA + iutA</i>	1,92

4	9x	17,31	25.	1. <i>hly + sfa/foc + fim + iutA</i>	1,92
			27.	2. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III + iutA</i>	1,92
			31.	3. <i>fim + kpsMT II + fyuA + ibeA (2x)</i>	3,85
			32.	4. <i>fim + kpsMT III + fyuA + iutA</i>	1,92
			33.	5. <i>fim + kpsMT III + iutA + ibeA</i>	1,92
			34.	6. <i>K1 + kpsMT II + iutA + ibeA (3x)</i>	5,77
5	6x	11,54	40.	1. <i>sfa/foc + fim + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,92
			41.	2. <i>sfa/foc + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA</i>	1,92
			42.	3. <i>fim + K1 + kpsMT II + iutA + ibeA</i>	1,92
			43.	4. <i>fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + ibeA (2x)</i>	3,85
			44.	5. <i>fim + kpsMT II + kpsMT III + iutA + PAI</i>	1,92
6	5x	9,62	46.	1. <i>hly + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + ibeA</i>	1,92
			48.	2. <i>pap + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,92
			51.	3. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (2x)</i>	3,85
			52.	4. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>	1,92
7	2x	3,85	55.	1. <i>pap + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	1,92
			56.	2. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA</i>	1,92
8	5x	9,62	59.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI</i>	1,92
			61.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (2x)</i>	3,85
			63.	3. <i>hly + pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	1,92
			67.	4. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	1,92
9	3x	5,77	68.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (2x)</i>	3,85
			69.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	1,92

Tabelle IV.52: Genkombinationen in den Urinklonen der Patienten mit Acimethin® - Therapie

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=39)	Laufende Nummer	Genkombinationen nach der Anzahl pos. PF	
				Pat. 2 (HF), Pat. 3 (CG), Pat. 8 (US) und Pat. 22 (IH)	Anteil in %
1	3x	7,69	3.	1. <i>fim</i>	2,56
			6.	2. <i>iutA (2x)</i>	5,13
2	7x	17,95	10.	1. <i>fim + kpsMT III (3x)</i>	7,69
			11.	2. <i>fim + fyuA</i>	2,56
			12.	3. <i>fim + iutA</i>	2,56
			13.	4. <i>K1 + kpsMT II</i>	2,56
			14.	5. <i>kpsMT III + iutA</i>	2,56
3	6x	15,38	18.	1. <i>sfa/foc + fim + iutA (2x)</i>	5,13
			19.	2. <i>fim + kpsMT III + iutA (2x)</i>	5,13
			21.	3. <i>kpsMT II + kpsMT III + fyuA</i>	2,56
			24.	4. <i>kpsMT III + iutA + ibeA</i>	2,56
4	4x	10,26	26.	1. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III + fyuA</i>	2,56
			27.	2. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III + iutA (2x)</i>	5,13
			29.	3. <i>fim + K1 + kpsMT III + fyuA</i>	2,56
5	3x	7,69	35.	1. <i>hly + sfa/foc + fim + fyuA + PAI</i>	2,56
			36.	2. <i>hly + sfa/foc + K1 + kpsMT II + ibeA</i>	2,56
			41.	3. <i>sfa/foc + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA</i>	2,56
6	4x	10,26	45.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + fyuA + PAI</i>	2,56
			47.	2. <i>hly + sfa/foc + K1 + kpsMT II + PAI + ibeA</i>	2,56
			52.	3. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA (2x)</i>	5,13
7	2x	5,13	54.	1. <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (2x)</i>	5,13
8	5x	12,82	60.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + PAI + ibeA</i>	2,56
			61.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	2,56
			65.	3. <i>pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	2,56
			66.	4. <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	2,56
			67.	5. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	2,56
9	3x	7,69	68.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	2,56
			69.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA (2x)</i>	5,13
10	2x	5,13	72.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA (2x)</i>	5,13

IV. Ergebnisse

Tabelle IV.53: Genkombinationen in den Stuhlklonen der Patienten ohne prophylakt. Therapie

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=29)	Laufende Nummer	Genkombinationen nach der Anzahl pos. PF	
					Anteil in %
0	1x	3,45	1.	1.	3,45
1	1x	3,45	5.	1. <i>fyuA</i>	3,45
2	4x	13,79	8.	1. <i>sfa/foc + kpsMT III</i>	3,45
			9.	2. <i>sfa/foc + ibeA (2x)</i>	6,90
			12.	3. <i>fim + iutA</i>	3,45
3	1x	3,45	17.	1. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III</i>	3,45
4	1x	3,45	28.	1. <i>sfa/foc + fim + kpsMT III + ibeA</i>	3,45
5	1x	3,45	39.	1. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA</i>	3,45
6	8x	18,75	49.	1. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA</i>	3,45
			50.	2. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	3,45
			51.	3. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	3,45
			52.	4. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA (5x)</i>	17,24
7	5x	17,24	53.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + ibeA</i>	3,45
			54.	2. <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (3x)</i>	10,34
			58.	3. <i>sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	3,45
8	5x	17,24	61.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	3,45
			62.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA</i>	3,45
			64.	3. <i>pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA + PAI</i>	3,45
			66.	4. <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	3,45
			67.	5. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	3,45
9	2x	6,90	70.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + kpsMT III + fyuA + iutA + PAI</i>	3,45
			71.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	3,45

Tabelle IV.54: Genkombinationen in den Urinklonen der Patienten ohne prophylakt. Therapie

Pos. PF	Klonanzahl	in % (n=25)	Laufende Nummer	Genkombinationen nach der Anzahl pos. PF	
					Anteil in %
0	1x	4,00	1.	1.	4,00
1	1x	4,00	3.	1. <i>fim</i>	4,00
4	2x	8,00	30.	1. <i>fim + K1 + kpsMT III + iutA (2x)</i>	8,00
5	2x	8,00	37.	1. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA</i>	4,00
			38.	2. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT III + iutA</i>	4,00
6	5x	20,00	52.	1. <i>fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + ibeA (5x)</i>	20,00
7	4x	16,00	54.	1. <i>pap + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (2x)</i>	8,00
			57.	2. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA (2x)</i>	8,00
8	6x	24,00	61.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI (2x)</i>	8,00
			62.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA (3x)</i>	12,00
			67.	3. <i>sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	4,00
9	3x	12,00	68.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI</i>	4,00
			69.	2. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + PAI + ibeA (2x)</i>	8,00
10	1x	4,00	72.	1. <i>hly + pap + sfa/foc + fim + K1 + kpsMT II + fyuA + iutA + PAI + ibeA</i>	4,00

V. Diskussion

Harnwegsinfektionen (HWI) gehören zu den häufigsten Infektionen des Menschen, insbesondere bei Frauen, und können in jeder Lebensphase auftreten. *Escherichia coli* Bakterien sind für 75 bis 90 % der Fälle von unkomplizierten Blaseninfektionen bei jungen Frauen verantwortlich, bei älteren Frauen noch für etwa 50 % der Fälle. In vielen Fällen kommt es zu erneuten Infektionen. Diese sind entweder auf eine Reinfektion mit dem gleichen *E. coli* Stamm zurückzuführen, der die erste Infektion verursachte, oder es handelt sich um eine Neuinfektion (Russo et al., 1995; Sonnenberg und Welch, 1996). Normalerweise gehören *E. coli* Bakterien zur natürlichen Darmflora des Menschen und bilden dort neben vielen anderen Bakterien eine transiente und residente Standortflora.

Uropathogene *E. coli* Bakterien (UPEC) zeigen im Gegensatz zu anderen *E. coli* Bakterien des Darmes spezifische Virulenzfaktoren, die es ihnen erst ermöglichen, extraintestinale Infektionen auszulösen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 167 *E. coli* Stuhlisolate und 186 *E. coli* Urinisolate von acht Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen untersucht. Diese 353 Isolate konnten per Definitionem 130 Klonen zugeordnet werden, wovon 81 Klone innerhalb der Stuhlisolate und 64 Klone innerhalb der Urinisolate vorkommen (16 Klone kommen sowohl in Stuhl- als auch in Urinproben vor). Mittels eines Multiplex-PCR-Ansatzes wurde ein Virulenzprofil der *E. coli* Isolate erstellt und es wurden vier Tests zur phänotypischen Charakterisierung durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausgewählte Isolate der definierten Klone mit Hilfe der Rep-PCR (repetitive extragenic palindromic elements; Versalovic et al., 1991; Woods et al., 1993) und der Pulsfeld-gelektrophorese (PFGE) (Schwartz und Cantor, 1984; Birren et al., 1988) auf Persistenzen von *E. coli* Stämmen hin überprüft. Es wurde nach Ähnlichkeiten innerhalb von PFGE-Mustern gesucht, um Stämme zu identifizieren, die möglicherweise aufgrund von DNA-Umlagerungen entstanden sind. Es wurden außerdem alle vorhandenen klinischen Daten über die Patientinnen gesammelt und mit den Labordaten in Beziehung gesetzt, auch unter dem Gesichtspunkt, daß vier der acht Patientinnen unter einer prophylaktischen Dauertherapie mit L-Methionin (Acimethin®) standen.

V.A Häufigkeiten der Virulenzfaktoren

Pathogene *E. coli* Stämme haben ihren Lebensraum zumeist in der Normalflora des Darmtraktes von Mensch und Tier. Sie unterscheiden sich von apathogenen Stämmen v.a. dadurch, daß sie gewisse Pathogenitätsfaktoren (PF) exprimieren, die ihnen die Virulenz erst verleihen, daher auch Virulenzfaktoren (VF) genannt. Eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren wurde erst durch vergleichende Studien beschrieben, die zusätzliche Eigenschaften pathogener Stämme identifizierten, die bei apathogenen Stämmen nicht oder nicht in solcher Ausprägung vorkommen (Johnson 1997; Sonnenberg und Welch, 1996).

Der Vergleich von Häufigkeiten zwischen verschiedenen Studien sollte sorgfältig und zurückhaltend erfolgen, wegen der verschiedenen Studiendesigns, des unterschiedlichen Patientengutes, der Anwendung verschiedener Methoden und wegen der oft unterschiedlichen Definitionen innerhalb der Studien (Johnson, 1997).

Die Tabelle V.1 dient zum Vergleich von Häufigkeiten aus verschiedenen Arbeiten und zeigt in den grau unterlegten Spalten die phäno- und genotypischen Häufigkeiten der Virulenzmerkmale der Urin- und Stuhlstämmen aus dieser Arbeit. Die Werte sind die Prozentwerte für die definierten Klone, die erwartungsgemäß zu den Häufigkeiten der Isolate (innerhalb gewisser Schwankungen) proportional sind. Die gelb und hellgelb unterlegten Spalten geben die Ergebnisse aus den Arbeiten von Brauchle (2002) und Maibaum (2003) wieder, die z.T. als Ergänzung zu dieser Arbeit angesehen werden müssen. Die nicht unterlegten Spalten zeigen die Häufigkeiten aus thematisch vergleichbaren Arbeiten, innerhalb derer diese Pathogenitätsfaktoren ebenfalls untersucht wurden.

Gegenüber den Stuhlklonen sind die genotypischen Häufigkeiten für folgende Virulenzfaktoren bei den Urinklonen erhöht: Hämolysin, P-Fimbrien, S- bzw. F1C-Fimbrien, K1-Kapselpolysaccharid, PAI-Marker und M-Blutgruppenadhäsine. Die Häufigkeiten der Gene, die für Typ-1-Fimbrien, Kapseln der Gruppe II und III, Yersiniabaktin und Aerobaktin codieren, einem Genlocus mit Assoziation für Meningitis (*ibe* = invasion of brain epithelium) sowie dem *rfa*-Gen (Polymerase für den LPS-Komplex) sind kaum unterschiedlich. Die Schwankungen für diese VF betragen maximal fünf Prozent. Das Gen *nfaE*, welches für das nicht fimbrielle Adhäsine Nfa-I codiert, wurde in keinem Isolat nachgewiesen. Das vermehrte Auftreten der o.g. Virulenzgene in den Urinklonen spricht für eine Bedeutung der isolierten Keime in der

Pathogenese der Harnwegsinfektion (Johnson, 1991a; Donnenberg und Welch, 1996, Johnson, 1997; Mühldorfer et al., 1999).

Tabelle V.1: Vergleich von Häufigkeiten [%] der Virulenzfaktoren in Urin- und Stuhlstämmen

Untersuchte phäno- und genotypische Merkmale	Virulenzfaktoren, für die Gene bzw. Gencluster der ersten Spalte codieren	Urinklone (n=64) aus dieser Arbeit	Urinklone (n=16) ^a aus der Arbeit von M. Maibaum	Urinklone (n=18) ^a aus der Arbeit von L. Brauchle	Urisolate (n=19) ^b von Pat. mit HWI	Urinstämmen (n>1773) ^c von Pat. mit HWI	Urinstämmen (n>507) ^c von Pat. mit PN	Isolate (n=75) ^d von Pat. mit Urosepsis	Stuhklone (n=82) aus dieser Arbeit	Stuhklone (n=46) ^a aus der Arbeit von M. Maibaum	Stuhklone (n=75) ^a aus der Arbeit von L. Brauchle	Stuhstämmen (n>422) ^c von Kontrollpatienten
Hly ^e	Hämolyse- bildung	35	47	^f 33		35	49		26	16	^f 5	12
<i>hlyA</i>		31	38	33	89			31	21	28	5	
Pap/Prs ^e	P-Fimbrien	36	33	^f 22					31	30	^f 7	
<i>papA</i>		41			74			79	28			
<i>papC</i>		41	56	22	74	43	68	77	32	26	20	
<i>papEF</i>		55			74			77	44			
<i>papG</i> Allel I		3	n.t.	n.t.	0			76	1	n.t.	n.t.	
<i>papG</i> Allel III		38	n.t.	n.t.	68			7	21	n.t.	n.t.	
Sfa ^e	S-Fimbrien bzw. F1C-Fimbrien	14	9	^f 17			^g 23		11	11	^f 1	
<i>sfa/focDE</i>		52	38	28	79			25	43	33	9	
Fim ^e	Typ-1-Fimbrien	75	59	^f 61		64	60		78	50	^f 51	
<i>fimH</i>		84	88	83	100			100	79	78	68	60
K1	K1-Kapsel	56	n.t.	11	0	22	32	28	34	n.t.	8	24
<i>kpsMT</i> II	Gruppe-II- Kapseln	61	n.t.	n.t.	84			63	57	n.t.	n.t.	
<i>kpsMT</i> III	Gruppe-III- Kapseln	23	n.t.	n.t.	11			1	24	n.t.	n.t.	
<i>fyuA</i>	Yersiniabaktin	63	n.t.	72	95			93	60	n.t.	39	
<i>iutA</i>	Aerobaktin	59	n.t.	44	21	59	73	80	63	n.t.	32	42
PAI	PAI-Marker	45	n.t.	n.t.	95			71	34	n.t.	n.t.	
<i>ibeA</i>	Assoziation mit Meningitis	41	n.t.	n.t.	0			5	40	n.t.	n.t.	

n.t. nicht getestet

^a Es wurden nicht immer dieselben Gene bzw. Genbereiche des VF untersucht

^b Johnson et al., 2001

^c Johnson, 1997

^d Johnson und Stell, 2000

^e Die Werte der phänotypischen Eigenschaften beziehen sich auf Isolate, nicht auf Klone

^f Die Werte beziehen sich auf Klone, nicht auf Isolate

^g Donnenberg und Welch, 1996 (PN-Isolate ohne Berücksichtigung des Wirtsstatus)

Besondere Aufmerksamkeit verdient das über 20 % häufigere Vorkommen des K1-Kapselantigens unter den Urinstämmen, wobei schon die Anzahl der K1 tragenden Stämme innerhalb der Stuhklone im Vergleich zu normalen Stuhlstämmen gesunder Probanden erhöht zu sein scheint. Kapseln sind stark mit Serumresistenz und evtl. mit Pyelonephritiden assoziiert (Johnson, 1991a; Donnenberg und Welch, 1996). Während sich verschiedene Studien über die Bedeutung des K1-Kapselantigens widersprechen, spricht die in dieser Studie vorliegende Erhöhung eher für eine Bedeutung von K1-Kapseln in der Pathogenese und/oder in der Prolongation der Erkrankung. Interessanterweise hatte die Häufigkeit von K1-Kapseln in der Arbeit von Brauchle (2002), also zu Beginn der Langzeitstudie, nur einen Wert von 11 % innerhalb der Urinstämme (und 8 % innerhalb der Stuhlstämmen).

Ebenfalls interessant ist die Tatsache, daß das Eisenaufnahmesystem Aerobaktin (dies gilt auch für das Yersiniabaktin) unter den Urinklonen (Aerobaktin: 59 %, Yersiniabaktin: 63 %) nicht häufiger vorkommt als unter den Stuhlstämmen (Aerobaktin: 63 %, Yersiniabaktin: 59 %), wobei die Häufigkeit in den Stuhlstämmen gegenüber Stuhlstämmen gesunder Testpersonen (Aerobaktin: 42 %) deutlich erhöht zu sein scheint (Johnson, 1991a; 1997). Da Aerobaktin wegen seiner Fähigkeit zur Eisenutilisation als wichtiger Kofaktor für Virulenz gilt, ist die Frage nach der Ursache für diese Verteilung von Bedeutung. Eventuell begünstigen gewisse (Wirts-) Faktoren die Ausbreitung des Kovirulenzfaktors Aerobaktin im Darmtrakt, was nachfolgend zu einer höheren Infektionsrate führen könnte. Zu Beginn der Langzeitstudie waren bei Brauchle (2002) nur 44 % der Urinstämme und 32 % der Stuhlstämmen als *iut*-positiv bzw. als *aer*-positiv getestet worden.

In früheren genotypischen Studien wurden die P-Fimbriengene in ca. 20 % der Fäkal-, 60 % der Zystitis- und ABU-Isolate, und in 80 % der Pyelonephritis-Isolate gefunden (Plos et al., 1995). Der Unterschied zwischen *pap*-positiven Isolaten in Stuhl und Urin war zu Beginn dieser Langzeitstudie nicht groß (*pap*-positive Stuhlstämmen 20 %, Urinstämme 22 % bei Brauchle, 2002), jedoch erhöhte sich der Anteil *pap*-positiver Urinstämme in dieser Untersuchungsperiode auf 41 % und bei den Stuhlstämmen wiesen 28 % das P-Fimbriengencluster auf, was jedoch im Vergleich zum Patientengut mit akuten HWI immer noch als gering einzustufen ist. Eine chronisch geschwächte Wirtsabwehr bzw. eine erhöhte immunologische Toleranz könnte dieses Phänomen gut erklären.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Multiplex-PCR das Adhäsigen *papG* genauer klassifiziert, welches drei verschiedenen Klassen zugeordnet werden kann (Johnson und Brown, 1996). Der überwiegende Teil der untersuchten Stämme weist das *papG* Allel III (*prsG_{J96}*) auf, welches mit UPEC-Stämmen in Verbindung gebracht wird (Marrs et al., 2005).

Es gibt einige Genloci, deren Vorkommen in Verbindung mit bakteriellen Meningitiden häufiger beobachtet wurde. In dieser Arbeit wurden die Stämme mit Hilfe der Multiplex-PCR auch auf das Vorhandensein des Genes *ibeA* untersucht, das bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch *E. coli* K1-Stämme eine Rolle spielt und auf einer 20 kb großen genomischen Insel lokalisiert ist (Huang et al., 2001). Es war kein Unterschied in den Häufigkeiten zu sehen, mit denen das Gen in Stuhl- und Urinisolaten nachweisbar war, jedoch muß auch hier wieder ein scheinbar generell gehäuftes Vorkommen dieses Genes im Vergleich zu anderen Arbeiten konstatiert werden. Die ähnlichen Häufigkeiten in Stuhl- und Urinstämmen sprechen eher für eine untergeordnete Rolle im Krankheitsprozeß, während das generell häufige Vorkommen Fragen nach der Ursache dieses Phänomens aufwirft.

Unter Berücksichtigung, daß die hier untersuchten Patientinnen überwiegend in einer inaktiven Phase ihrer Erkrankung waren und daß es sich innerhalb dieses Patientengutes um chronische Krankheiten mit jahrelangen Verläufen handelt, sind die relativ geringen Unterschiede zwischen den Stuhl- und Urinklonen im Vergleich zu anderen Arbeiten möglicherweise dadurch erklärbar, daß weniger Virulenzfaktoren Vorteile für das Überleben des Erregers bringen. Zum einen könnten sich die Erreger durch ein kleineres Genom schneller vermehren und zum anderen würden sie weniger immunogene Faktoren exprimieren (Blum et al., 1994), was sie besser vor der Immunabwehr des Wirtes schützt.

Möglicherweise sind aber auch weniger Virulenzfaktoren für einen Erreger notwendig, um in einem chronisch vorgeschädigten Organismus zu persistieren und fast alle der hier untersuchten Patientinnen haben Gewebeschäden durch ihre rezidivierenden Entzündungen. Dieser Erklärungsansatz wird durch die Beobachtung von Fünfstück und Mitarbeitern gestützt, daß die Wahrscheinlichkeit, Stämme ohne Virulenzfaktoren aus dem Urin zu isolieren, mit der Dauer einer chronisch rezidivierenden HWI zunimmt (Fünfstück et al., 1997).

➤ Fazit:

Insgesamt erlaubt der Vergleich der Stuhlstämmen aus dieser Arbeit mit denen aus den Arbeiten von Brauchle (2002) und Maibaum (2003) und mit den Stuhlstämmen gesunder Probanden die Aussage, daß die Häufigkeiten der untersuchten VF in den Stuhlklonen dieser Arbeit z.T. deutlich höher liegen, was am ehesten Folge der Chronizität der Erkrankung sein dürfte. Außerdem erscheint der prozentuale Unterschied des Vorkommens von VF zwischen Urin- und Stuhlstämmen in dieser Arbeit fast durchgehend geringer zu sein als in anderen Arbeiten.

V.B Genkombinationen

Der Vergleich von Genkombinationen sowohl innerhalb einer Arbeit als auch unter verschiedenen Arbeiten kann für definierte Patientengruppen neue Erkenntnisse über die Bedeutung bestimmter Virulenzfaktoren, die häufiger zusammen auftreten als andere, bringen. Zumindest aber darf man hoffen, daß sich Tendenzen von oder Hinweise auf bestimmte VF-Kombinationen ergeben, die dann weiter evaluiert werden könnten.

Bei der Analyse der Genkombinationen wichtiger Virulenzfaktoren innerhalb der Stuhl- und Urinklone fiel auf den ersten Blick auf, daß sich die Verteilung der Genkombinationen nach ihren VF nicht sehr unterscheidet. Die Abbildung IV.54 zeigt jeweils für Stuhl- und Urinklone einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abszisse: Anzahl der PF, Ordinate: Häufigkeit). Auf den zweiten Blick fällt dann aber auf, daß es unter den Stuhlklonen ein größeres Spektrum an Kombinationen gibt als unter den Urinklonen. Die 16 in Stuhl und Urin gemeinsam vorkommenden Genkombinationen bilden unter den Stuhlklonen einen Anteil von 42,7 % und unter den Urinklonen einen Anteil von 62,5 %. Man erkennt weiterhin, daß ein und dieselbe Genkombination mit sechs PF sowohl bei den Stuhl- (7,32 %) als auch bei den Urinklonen (10,94 %) sehr häufig vorkommt (*fim* + K1 + *kpsMT II* + *fyuA* + *iutA* + *ibeA*). Außerdem kann man aus den Tabellen IV.47 und IV.48 ersehen, daß fast alle Kombinationen mit acht Pathogenitätsfaktoren, die in Urinklonen gefunden wurden, auch bei den Stuhlstämmen mit derselben PF-Anzahl vorkommen. Das gleiche gilt für die Genkombinationen mit neun PF.

Diese Datenlage untermauert die Aussage, daß uropathogene *E. coli* häufig aus dem Erregerreservoir Darm stammen (Mühldorfer et al., 1999). Auch scheinen v.a. *E. coli*

mit einer höheren Anzahl an PF und/oder einer bestimmten Kombination von PF uropathogen zu sein.

➤ *hlyA* und *pap*

Das für das Toxin α -Hämolyysin codierende Gencluster wird sehr häufig mit den P-Fimbriengen zusammen gefunden und wurde mit Epithelzellenadhärenz und Serumresistenz assoziiert (Johnson, 1991a). Auch trägt α -Hämolyysin durch Zytolyse (Eisenfreisetzung) und Beeinflussung phagozytotischer Wirtskomponenten zur Virulenz von *E. coli* bei (Donnenberg und Welch, 1996). Es ist bekannt, daß beide Gencluster zusammen innerhalb der sog. Pathogenitätsinsel PAI II₅₃₆ des uropathogenen *E. coli* Stammes 536 auftreten können (Blum et al., 1994). Diese Genkombination wurde auch in anderen UPEC-Stämmen nachgewiesen (Swenson et al., 1996, Schmidt und Hensel, 2004).

Das α -Hämolyysin ist bei den Urinstämmen dieser Arbeit mit 31 % deutlich häufiger zu finden als bei den Stuhlstämmen, bei denen nur 21 % *hlyA* positiv sind. Innerhalb der Stuhklone tragen 13,4 % *hly*- und *pap*-Gene gemeinsam, während bei 26,7 % der Urinstämme beide VF vorhanden sind.

Diese Daten belegen zwar nicht eindeutig eine Kopplung beider Gencluster, aber sie weisen auf diese Möglichkeit hin. In jedem Fall wird die Wichtigkeit der Hämolyse für die Pathogenese durch die erhöhten Prozentwerte bei den Urinstämmen hervorgehoben.

Bleibt noch nachzutragen, daß es bei den phänotypischen Tests zwei Isolate gab, die trotz deutlicher Agglutination *hly*-negativ waren (mehrfache Überprüfungen). Wenn es sich bei diesen beiden Isolaten um *E. coli* handelt, muß man entweder von falsch-negativen genotypischen Ergebnissen z.B. aufgrund einer Mutation oder von Wechselwirkungen mit nicht getesteten Adhäsinen (z.B. Nfa-II bis VI) oder anderen Oberflächenmolekülen ausgehen.

➤ *pap/prs* bzw. *pap* und K1

K1-Kapseln werden mit dem Virulenzmerkmal Serumresistenz in Verbindung gebracht. K1-Kapsel tragende *E. coli* Stämme exprimieren mit hoher Wahrscheinlichkeit auch P-Fimbrien (Donnenberg und Welch, 1996).

In dieser Arbeit wurde bei 34 % der Stuhklone das K1-Kapselantigen nachgewiesen und bei 11 % kam K1- und das *pap*-Gencluster gleichzeitig vor. Analog dazu wurde K1

in 56 % aller Urinklone gefunden und K1 kommt in 25 % gemeinsam mit dem Operon für P-Fimbrien vor.

Diese Zahlen bestätigen eine Bedeutung der K1-Kapsel als VF, da sie für die Urinstämme deutlich höher liegen. Mit diesen Daten kann man auch nicht ausschließen, daß diese beiden Pathogenitätsfaktoren auf irgendeine Art und Weise genetisch gekoppelt vorliegen. Die Operons oder zumindest entsprechende Regulatorgene könnten z.B. auf Pathogenitätsinseln zusammen liegen (Morschhäuser et al., 1994; Mühldorfer et al., 1999).

➤ *pap/prs* bzw. *pap* und *iutA*

Das Eisenaufnahmesystem Aerobaktin ist mit anderen VF v.a. aber mit P-Fimbrien assoziiert (Johnson, 1991a). In dieser Arbeit kommen die beiden VF in 15,9 % der Stuhlstämmen und in 21,9 % der Urinstämmen gemeinsam vor. Alle Stämme, die *iutA*-positiv sind und das *pap*-Gencluster tragen, exprimieren auch P-Fimbrien *in vitro*. (Ausnahme: Die Stuhlstämmen der Pat. 8 (US) zeigen keine P-Fimbrien *in vitro*.)

Es liegt zwar ein erhöhte Koinzidenz beider VF innerhalb der Urinklone vor, allerdings bleibt es fraglich, ob man aufgrund dieser Daten eine Assoziation beider VF bestätigen kann. Da für P-Fimbrien eine geringere Häufigkeit bei chronischen, komplizierten HWI beobachtet wurde, ist ihre Bedeutung bei der Entstehung akuter Pyelonephritiden doch sehr viel größer (Donnenberg und Welch, 1996), könnte es sein, daß mit dem Verlust der P-Fimbriengene auch der Verlust des Aerobaktinengusters einhergeht, z.B. wenn beide Gencluster und/oder deren Regulation von PAI-Strukturen codiert würden (Mühldorfer et al., 1999).

➤ *fimH* und *iutA*

Es wurde ein höheres Risiko für eine Reinfektion des Harntraktes beschrieben, wenn bei der Erstinfektion Typ-1-Fimbrien und Aerobaktin positive Stämme gemeinsam eine Rolle gespielt haben (Foxman et al., 1995a). In dieser Arbeit sind es 53,1 % aller Stuhlklone und 50,0 % aller Urinklone, die beide genetische Anlagen tragen und ungefähr drei Viertel (¾) aller Stuhl- und Urinstämme exprimierten die Typ-1-Fimbrien auch *in vitro*. Typ-1-Fimbrien werden jedoch sowohl von pathogenen wie apathogenen Stämmen sehr häufig exprimiert (Donnenberg und Welch, 1996) und sie erlangen v.a. Bedeutung bei der Entstehung von Zystitiden (Svanborg et al., 1994). Auch wurde nachgewiesen, daß zufällige Punktmutationen im *fimH*-Gen die Virulenz von *E. coli*

erhöhen können (Sokurenko et al., 1998) und daß Typ-1-Fimbrien mit Vernarbungen der Nieren assoziiert sind (Topley et al., 1989; Johnson, 1991a).

Gegenüber der Arbeit von Brauchle (2002), in der nur 30 % der Stuhl- und 40 % der Urinklone die Gene für die beiden VF gemeinsam trugen, ist das ein Anstieg, v.a. innerhalb der Stuhklone. Da es jetzt keinen nennenswerten Unterschied mehr zwischen Stämmen aus Stuhl und Urin gibt, darf man vermuten, daß diese Genkombination zumindest bei chronischem Krankheitsverlauf keine große Bedeutung (mehr) hat.

➤ *iutA* und *fyuA*

Eisenaufnahme ist für *E. coli* Bakterien essentiell, v.a. in eisenarmen Umgebungen. Beide Eisenaufnahmesysteme kommen in Stuhl- und Urinklonen mit etwa den gleichen Häufigkeiten vor (59 bis 63 %). Mindestens eines der beiden Systeme besitzen 80,5 % der Stuhklone und 89,1 % der Urinklone. Das spricht für die Wichtigkeit der Siderophore für diese Keime (Donnenberg und Welch, 1996).

Das gemeinsame Vorkommen von *iutA* und *fyuA* innerhalb der Stuhlstämmen beträgt 43,9 % und innerhalb der Urinstämme 37,5 %. Dies spricht dafür, daß Aerobaktin, dem in anderen Arbeiten eine große Bedeutung zugeschrieben wird, eine eher untergeordnete bzw. eine mit Yersiniabaktin gleichwertige Rolle bei der hier untersuchten Patientengruppe hat. Es wäre vorstellbar, daß pathogene Keime aufgrund organischer Vorschädigungen des Wirtes schon per se besser an Eisen kommen, so daß die Vorteile von Aerobaktin nicht mehr so wichtig für das Bakterium sind.

➤ *sfa/foc*

Die Gene *sfa/focDE* kommen bei 43 % der Stuhklone und bei 52 % der Urinklone vor. Im Hämagglutinationstest, der nur für S-Fimbrien spezifisch ist, wurden jedoch nur 8,5 % der Stuhklone und nur 14,1 % der Urinklone positiv getestet. Diese Daten sprechen dafür, daß die meisten Stuhl- und Urinstämme, die in der Multiplex-PCR positiv getestet wurden, das F1C-Fimbriengencluster tragen, somit F1C-Fimbrien aber eben wohl zumeist keine S-Fimbrien exprimieren.

S-Fimbrien binden an verschiedene Oberflächen von Uroepithelzellen, an Tamm-Horsfall-Protein, mit dem sie wohl größtenteils aus dem Harntrakt ausgeschwemmt werden, und an Laminin, einem Matrixprotein und Bestandteil von Basalmembranen. Sie haben immunmodulatorische Wirkung und werden v.a. mit Meningitiden bei

Neugeborenen und Bakteriämie assoziiert (Johnson, 1991a; Morschhäuser und Hacker, 1994). In Stuhlisolaten von gesunden Kontrollpatienten sind sie mit ähnlicher Häufigkeit wie in Urinisolaten von Patienten mit HWI zu finden (Donnenberg und Welch, 1996).

V.C Persistenzen von *E. coli* Stämmen

Ein mögliches Reservoir für harnwegsinfizierende *E. coli* Bakterien stellt die Flora des Gastrointestinaltraktes dar. Zum einen könnte ein zahlenmäßig dominanter Keim aus dem Stuhl die Ursache für eine Harnwegsinfektion sein. Zum anderen könnten aber auch Keime, die eine bestimmte Ausstattung an Virulenzfaktoren aufweisen, die Ursache für Harnwegsinfektionen sein. Der Nachweis von Persistenzen bei Urinstämmen ist interessant, da man einen selektierten Pool von Erregern erhält, die die notwendigen Fähigkeiten zur Persistenz ausprägen. Ein solcher Bakterienpool führt weiter zu einer Analyse, welche Fertigkeiten des Erregers verantwortlich für die Auslösung oder Prolongation der untersuchten Krankheit und/oder für die Überdauerung im Wirt sein könnten. Des Weiteren sind aufgetretene Veränderungen innerhalb dieses Pools im zeitlichen Verlauf von Interesse, um Rückschlüsse auf Ursachen der Chronizität einer Erkrankung zu ziehen.

Hinsichtlich der Untersuchung von Persistenzen ist dieses Kapitel als Zusammenfassung der Ergebnisse aus dieser Arbeit und den Dissertationen von Brauchle und Maibaum zu sehen (Brauchle, 2002; Maibaum, 2003). Die Studien der beiden Vorgängerinnen beschäftigten sich ebenfalls u.a. mit dem Rep-PCR-Screening von Stuhl- und Urinisolaten und dem Vergleich der DNA-Profile von Stämmen mittels Pulsfeldgelelektrophorese. In dieser Arbeit wurden Stuhl- und Urinproben von acht Patientinnen untersucht. Sechs dieser Patientinnen (Patientin 1, 2, 3, 5, 8, 11) wurden über den Gesamtstudienzeitraum (1997 - 2000) beobachtet.

Tabelle V.3 faßt für den Gesamtstudienzeitraum patientenweise alle *E. coli* Isolate zusammen, die über mehr als ein Abnahmedatum hinweg (Persistenz) oder an einem Abnahmedatum in Stuhl und gleichzeitig in Urin (Koexistenz) gefunden wurden. Diese Tabelle ist eine Kurzfassung der Tabelle VIII.2 (siehe Anhang), in der alle an Persistenzen oder an Koexistenzen beteiligten Isolate mit ihren wichtigsten Pathogenitätsfaktoren aufgelistet sind.

Tabelle V.2: Persistenzen oder zeitliche Koexistenzen von *E. coli* Isolaten aus Stuhl- und Urinproben während des Gesamtstudienzeitraumes (1997-2000)

Patientin	Persistenzen oder zeitliche Koexistenz in Stuhl und Urin [Datum [Buchstabencode] (U = Urin, S = Stuhl)]	Gesamtdauer [Monate]
Pat. 1 (CB)	F (U) → G (U) → H (S+U) → I (U+S) K (U+S) → P (U) K (S) → P (U+S) O (U+S) Q (U) → R (U)	8 ½ 14 14 0 2 ¾
Pat. 2 (HF)	E (S+U) → G (S) → L (S) → M (S) → O (U) I (S) → K (S) K (S) → L (S)	24 3 2
Pat. 3 (CG)	C (S) → H (S) → K (S) → L (S) → N (S) → O (S+U) G (S+U) I (S) → M (S) P (S) → Q (S) P (U) → Q (U) T (U+S) → U (U) U (U+S)	9 0 1 2 2 2 ½ 0
Pat. 5 (EM)	B (U) → C (U) → D (U) C (S) → D (S) E (U) → F (U+S)	17 ¼ 13 ¾ 2 ¾
Pat. 8 (US)	C (S) → D (S) G (S) → I (S) N (U+S) → O (U) → P (U)	2 6 5
Pat. 11 (SH)	D (U+S) → E (S) F (U+S) F (U+S)	4 ½ 0 0
Pat. 22 (IH)	A (S) → B (U) B (S+U) D (S+U) K (U+S)	¼ 0 0 0
Pat. 29 (SJ)	KEINE Persistenzen oder Koexistenzen	0

Bei sechs Patientinnen kommt es in einem Gesamtbeobachtungszeitraum (17.04.1997 bis 28.06.2000) von 38 ½ Monaten 18-mal vor, daß ein Stamm in Stuhl und Urin gleichzeitig nachgewiesen werden konnte (Koexistenzen). Für zehn dieser Koexistenzen wurde der gleiche Stamm zu früheren und/oder späteren Zeitpunkten nochmals gefunden (Persistenzen).

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Virulenzfaktorgene innerhalb dieser Gruppe von *E. coli* Stämmen, die entweder in Stuhl und Urin persistierten oder am gleichen Abnahmedatum nachgewiesen werden konnten, so zeigt sich, daß die Typ-1-Fimbriengene in 95 % aller Isolate vorkommen (Stuhl: 95 %, Urin: 94 %). Es folgen die Gene für die beiden Eisenaufnahmesysteme Yersiniabaktin mit 85 % und Aerobaktin

mit 63 % Anteil am Gesamtvorkommen. Die Verteilung in Stuhl- und Urinisolaten der beiden VF bringt jedoch erst eine genauere Aussage bezüglich ihrer möglichen Rollen in der Pathogenese von komplizierten HWI. Während nämlich *Yersiniabaktin* innerhalb der Urinisolate überrepräsentiert ist (Stuhl: 80 %, Urin: 91 %), verhält es sich mit *Aerobaktin* genau umgekehrt (Stuhl: 77 %, Urin: 50 %). Als nächstes treten in der Reihe der Häufigkeitsverteilungen die K1-Kapselgene auf. Sie kommen bei 58 % aller Isolate (Stuhl: 47 %, Urin: 69 %) vor, gefolgt von S-Fimbriengenen, die bei der Hälfte der Isolate vorkommen (Stuhl: 43 %, Urin: 59 %). Die restlichen Virulenzfaktoren sind in absteigender Reihenfolge P-Fimbrien (41 %), α -Hämolysin (36 %) und zytotoxisch nekrotisierender Faktor 1 (34 %), wobei alle in Urinstämmen deutlich häufiger vorhanden sind, *hlyA* und *pap* etwa 2-fach und *cnf-1* sogar 4-fach häufiger. Das Bemerkenswerte am Vorkommen des *cnf 1*-Gens ist, daß es immer nur in Verbindung mit dem *hly*-Gencluster auftritt (100 %), was früheren Feststellungen entspricht (Johnson, 1991a; Brauchle 2002; Maibaum, 2003).

Die aufgetretenen Unstimmigkeiten innerhalb der Ergebnisse für einen Virulenzfaktor können verschiedene Ursachen haben. Da in den drei verschiedenen Arbeiten für den Test auf bestimmte VF z.T. unterschiedliche Primer für z.T. unterschiedliche Gene ein und desselben Operons benutzt wurden, könnte es sein, daß das ein oder andere Ergebnis falsch positiv ausgefallen ist. Zum Beispiel könnte der Unterschied bei den Isolaten **8G2** und **8I1** darauf beruhen, daß *fimH* zwar vorhanden ist, aber andere Gene des Operons eben nicht vorhanden sind (*fimH*-Test ist negativ) und damit Typ-1-Fimbrien von diesem Stamm nicht exprimiert werden (können). Das zeigt, daß man nicht immer davon ausgehen darf, daß das Operon für einen VF komplett vorhanden ist, wenn man nur auf einen Teil der Gene dieses Operons testet. Möglicherweise handelt es sich bei manchen Unstimmigkeiten auch um DNA-Deletionen, die von einem der beiden oder beiden Fingerprintingmethoden (Rep-PCR und PFGE) nicht erfaßt wurden, weil die Primerbindungsstellen bzw. die Restriktionsenzymchnittstellen unabhängig von den entsprechenden Genomfragmenten gelegen waren. Solche Fehldetektionen der Fingerprinting-Methoden können auch erklären, warum manche Stämme mit demselben PFGE-Bandenmuster unterschiedliche Rep-PCR-Muster innerhalb der zugehörigen Isolate zeigen (Russo et al., 1995). Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bei manchen VF-Tests mittels PCR können auch Mutationen innerhalb des interessierenden Genes sein, die sich auf die Primerbindung ausgewirkt haben, auch ohne daß die Virulenz des Erregers dadurch verloren geht

(s.u.; Sokurenko et al., 1998). Man muß außerdem bedenken, daß alle drei angewandten Methoden mit einer gewissen Fehlerquote behaftet sind.

Die Häufigkeitsanalyse der Virulenzfaktoren innerhalb persistierender oder koexistierender Stämme scheint die Feststellung zu bestätigen, daß bei chronischer HWI die Bedeutung der Virulenzfaktoren, die sonst v.a. für akute Pyelonephritiden verantwortlich gemacht werden (*hly*, *pap*, *cnf-1*), in den Hintergrund rückt (Johnson, 1991a; Sonnenberg und Welch, 1996). Möglicherweise hat das mit der Immunabwehr des Wirtes zu tun, mit bestimmten Regulationsmechanismen von *E. coli* oder mit beidem.

Stärker immunogene VF sind nach Etablierung im Organ des Wirtes eventuell ein Nachteil für extraintestinale *E. coli*, so daß diese Faktoren unter dem natürlichen Selektionsdruck „abgestoßen“ werden, z.B. durch Exzision von Pathogenitätsinseln, auf denen die Gene bzw. Regulatorgene für diese VF u.a. auch liegen könn(t)en (Hacker et al., 1990; Blum et al., 1994; Morschhäuser und Hacker, 1994). Selbst bei vorgeschädigtem Organismus und schwacher Wirtsabwehr wäre es denkbar, daß die Erreger versuchen, ihr Genom zu verkleinern, um sich (Wachstums-) Vorteile zu sichern (Hacker et al., 1990; Blum et al., 1994). Es könnte natürlich auch sein, daß sich andere Bakterien durchsetzen, die weniger VF tragen und somit weniger immunogen wirken, während die immunogeneren Stämme von der Abwehr eliminiert werden. Für Stämme, die α -Hämolyisin, S-Fimbrien und CNF 1 codieren, wurde eine Senkung des Rezidivrisikos nachgewiesen (Foxman et al., 1995b). Die Entdeckung stützt diese These genauso wie die Beobachtungen anderer Autoren, daß bei Chronizität von HWI eher Stämme mit weniger VF zu finden sind (Johnson, 1991a; Sonnenberg und Welch, 1996).

Nach der Datenlage scheinen tatsächlich die Faktoren die Oberhand zu gewinnen, die sonst nicht so sehr mit komplizierten HWI assoziiert sind. Die starke Präsenz von Typ-1-Fimbrien und Yersiniabaktin, das häufig zusammen mit dem *irp*-Gencluster auf einer sog. HPI (= high pathogenicity island) liegt, fällt sofort auf (Heesemann et al., 1993; Schubert et al., 1998). Es sind einige Gründe denkbar, die zu dieser Entwicklung beitragen könnten. So muß man vermuten, daß Vorinfektionen nicht nur das Gewebe schädigen, sondern auch lokale Abwehrmechanismen beeinträchtigen. Gewebeschäden könnten für Typ-1-Fimbrien v.a. wegen eines leichteren Zugangs zu Laminin, einem Matrixprotein und Bestandteil von Basalmembranen, von Vorteil sein, da sie an dieses Protein binden können (Korhonen et al., 1997). Außerdem könnten

Vorschädigungen bei der einen oder anderen Patientin auch Auswirkungen auf die Tamm-Horsfall-Protein-Ausscheidungen haben. Da S- und Typ-1-Fimbrien an THP binden (Donnenberg und Welch, 1996), und dadurch aller Wahrscheinlichkeit nach zu einem Großteil aus dem Harntrakt eliminiert werden können, würde dann ein unspezifischer Abwehrmechanismus fehlen. Beachten muß man auch, daß THP mit zunehmendem Alter in geringeren Mengen sezerniert wird (Sobel und Kaye, 1985) und es sich bei einigen dieser Probanden auch um ältere Patientinnen jenseits der Menopause handelt, was ohne Östrogensubstitutionstherapie an sich schon ein zusätzliches Risiko zu sein scheint (Agace et al., 1996). Für das Adhäsigen *fimH* der Typ-1-Fimbrien wurden auch Mutationen beschrieben, die die Bindungsstärke der Fimbrien erhöhen können (Sokurenko et al., 1998). Dies könnte auch ein potentieller Pathomechanismus sein, v.a. in vorgeschädigtem Gewebe evtl. sogar in Verbindung mit einer lokalen oder systemischen Abwehrschwäche. Das Merkmal „K1-Kapseln“, das im Vergleich zur Gesamtheit aller untersuchten Stämme v.a. innerhalb persistierender Urinstämme vermehrt gefunden wurde, scheint nicht nur bei Pyelonephritiden, Bakteriämie bei Neugeborenen und Meningitis, sondern auch bei chronischen Infektionen durch *E. coli* eine Rolle zu spielen (Johnson, 1991a; Donnenberg und Welch, 1996).

➤ Fazit:

- 1.) Die Eigenschaften von sonst als schwach pathogen charakterisierten Keimen scheinen bei chronischen Verläufen von komplizierten HWI auszureichen, um eine Exazerbation hervorzurufen bzw. die Krankheitsdauer zu verlängern. Dabei scheinen die weit verbreiteten Typ-1-Fimbrien und Systeme zur Eisenaufnahme eine besondere Rolle zu spielen.
- 2.) Es wird deutlich, daß man verschiedene Arten von Harnwegsinfektionen genau unterscheiden sollte. Selbst die Gruppe der Pyelonephritiden muß noch weiter differenziert werden in akute und chronische Formen und auch dabei wird sich wahrscheinlich noch eine Gruppenbildung (nach Risikofaktoren) herauskristallisieren.

V.D DNA-Umlagerungen

Der Vergleich der PFGE-Bandenmuster der Isolate untereinander sollte Persistenzen und zeitliche Koexistenzen aufdecken und sollte gleichzeitig potentielle Kandidaten für eine stattgefundene DNA-Umlagerung im Vergleich zu vorher charakterisierten

Stämmen identifizieren. Man geht davon aus, daß Bandenverschiebungen (Bandenshifts) in gewissen Bereichen DNA-Umlagerungen widerspiegeln. Diese so identifizierten Kandidaten könnten eventuell eine Gruppe von Stämmen bilden, die ihr Genom verändert haben. DNA-Umlagerungen wie z.B. der Verlust von Pathogenitätsinseln könnten einen generellen Mechanismus zur Modulation der bakteriellen Virulenz darstellen (Hacker et al., 1990).

Leider wurde durch diese Studie nur eine geringe Anzahl solcher Kandidaten mit DNA-Umlagerungen identifiziert. In den bisher im Institut durchgeführten Folgeuntersuchungen haben sich einige Ähnlichkeiten innerhalb der PFGE-Muster jedoch schon als das Vorhandensein einer Mischpopulation herausgestellt. Dies wäre auch ein Erklärungsansatz dafür, weshalb für manche dieser Isolate keine verwertbaren PFGE-Muster zu gewinnen waren. Möglicherweise sind auch andere Erreger als *E. coli* an den rezidivierenden Infektionen v.a. bei Pat. 2 (HF) beteiligt, was unter dem Gesichtspunkt der Mischinfektion die hohe Anzahl an nicht auswertbaren Pulsfeldblöckchen aus den Urinproben dieser Patientin erklären würde.

Doch scheint bei Pat. 2 (HF) auch ein echter Bandenshift vorgekommen zu sein. Hierbei ist deutlich eine Bandenverschiebung im Bereich zwischen 290 und 340 kb bei genotypischer Identität erkennbar (Abbildung IV.12).

Die Einschränkungen, denen die angewandten Screeningmethoden unterliegen, sind bereits im Kapitel über Persistenzen angesprochen worden. An dieser Stelle soll noch hinzugefügt werden, daß es möglicherweise genetisch unterschiedliche *E. coli* Stämme gibt, die trotzdem das gleiche PFGE-Bandenmuster zeigen, wie die Arbeit von Russo und Kollegen vermuten läßt (Russo et al., 1995). Man könnte also spekulieren, ob die Pulsfeldgelelektrophorese nicht eher eine ungeeignete Methode ist, solche diskrete, genomische Unterschiede in ausreichender Anzahl und Genauigkeit zu erfassen. Wenn DNA-Umlagerungen eher seltene Ereignisse sind, könnte es auch durchaus sehr schwierig sein, sie nachzuweisen. Das bedeutete, daß die Zahl und die Frequenz der untersuchten Isolate zur Detektion des Phänomens auch in dieser Studie noch zu gering sein könnte, was folglich noch weiteren Aufwand in der Forschung voraussetzte.

V.E Klinische Aktivität

Im Untersuchungszeitraum dieser Arbeit hatten von den acht untersuchten Patientinnen nur zwei (beide unter Acimethin®) Exazerbationen ihrer chronischen Erkrankung. Klinisch aktive Phasen wurden bei Pat. 8 (US) am 12.05.1999 (K) und am

19.01.2000 (N) sowie bei Pat. 22 (IH) am 31.03. und nachfolgend am 07.04.1999 (E und F) gefunden.

Bei Pat. 22 (IH), die zum Zeitpunkt E mit akuten Symptomen in die Klinik kam, konnte aus der Urinprobe kein *E. coli* Isolat angezüchtet werden und aus der Stuhlprobe konnten nur zwei Klone (22KL5 und 6) isoliert werden, die Typ-1-Fimbrien exprimieren und beide getesteten Eisenaufnahmesysteme besitzen. Die Stuhl- und Urinprobe der folgenden Kontrolluntersuchung F ergaben keinerlei Wachstum auf einem Selektivnährboden, was nicht verwunderlich ist, weil die Patientin zu diesem Zeitpunkt mit dem Antibiotikum Berlocobin® (Folsäurereduktasehemmer Trimethoprim und Sulfonamid Sulfamerazin) behandelt wurde. Auch zu den folgenden zwei Untersuchungsterminen G und H (13.04.1999 und 26.05.1999) blieben die entnommenen Proben ohne Wachstum. Erst nach Absetzen des Antibiotikums konnte wieder ein Probenwachstum festgestellt werden.

Pat. 8 (US) hat sich bis zum Abnahmedatum K bereits selbst mit der Einnahme von Tavanic® (Chinolon Levofloxacin) geholfen, nachdem sie wenige Tage zuvor einen weiteren HWI-Schub erlitten hatte. Die Urinprobe zu diesem Untersuchungstermin wuchs dementsprechend nicht an und bei den Isolaten der Stuhlprobe konnten bis auf Typ-1-Fimbrien und Aerobaktin keine weiteren Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. Eine neuerliche Infektion zum Zeitpunkt N zeigte bereits in der klinischen Diagnostik mit selektiven Urineintauchnährböden wieder *E. coli* Bakterien. In den Isolaten aus der Urinprobe wurden dann v.a. α -Hämolyisin-, S-Fimbrien-, Typ-1-Fimbrien- und Kapselgene (K1 und *kpsMT II*) nachgewiesen, jedoch keine Eisenaufnahmesysteme. In den Stuhlisolaten wurden im Wesentlichen nur die Faktoren K1 und *kpsMT II* positiv getestet. Interessanterweise wurden an den beiden folgenden Kontrollterminen O und P (29.03.2000 und 21.06.2000), zu denen sich die Patientin wohl fühlte und als klinisch inaktiv eingestuft wurde, in den Urinproben exakt dieselben *E. coli* Stämme (PFGE-Muster XXVI) wie zu dem Zeitpunkt N gefunden.

Diese Konstellation läßt vermuten, daß entweder die Immunabwehr der Patientin entsprechend geschwächt war (hierbei mag auch eine gewebliche Vorschädigung bei chronischem Krankheitsverlauf eine Rolle spielen) und/oder der Stamm sich *in vivo* weniger virulent verhält als *in vitro* nachzuweisen ist. Jedenfalls läßt sich die Beobachtung, daß die Virulenz eines Stammes mit längerer Persistenz abnimmt hierdurch bestätigen (Fünfstück et al., 1997). Man könnte in diesem Fall hinzufügen, daß dies sogar bei gleich bleibenden Virulenzfaktoren (*in vitro*) gilt. Das Beispiel veranschaulicht auch, daß sich die aus Stuhl isolierten Stämme mit relativ wenigen

Virulenzfaktoren präsentieren, während der nachweislich selbe Stamm (PFGE) in der Urinprobe eine Vielzahl von Virulenzfaktoren aufweist.

Wenn man diese Daten zugrunde legt, kann man damit tendenziell die Ergebnisse aus den Arbeiten von Brauchle (2002) und Maibaum (2003) bestätigen, daß sich sowohl die Urin- als auch die Stuhklone bei aktiven Phasen nur geringfügig von denen der inaktiven Intervalle zu unterscheiden scheinen. Es handelt sich in den aktiven Krankheitsphasen um relativ apathogene Stuhlstämmen, die alle mit Typ-1-Fimbrien und mindestens einem Eisenaufnahmesystem ausgestattet sind. Die Beobachtung von Brauchle, daß sehr viele Urinstämme aus klinisch aktiven Phasen die Kombination aus den Genclustern *fim*, *iut*, *fyu* und *irp* aufweisen, kann bei der Datenlage dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Jedoch kann bestätigt werden, daß Urinstämme in aktiven Phasen eher keine P-Fimbrien zeigen bzw. benötigen (Johnson, 1991a). Beim gefundenen Urinstamm lassen sich vermehrt Pathogenitätsfaktoren nachweisen, was die Untersuchungsergebnisse von Maibaum bezüglich der Bedeutung von α -Hämolyisin und S-Fimbrien bei Aktiv-Phase-Urinstämmen hervorhebt. Wenn man diesen einen Urinstamm zu Grunde legen kann, dann wird hier auch die Bedeutung für Kapseln hinsichtlich der Virulenz von UPEC nochmals betont.

Abschließend sei noch angemerkt, daß die Patientinnen über sehr viel Erfahrung im Umgang mit ihrer Krankheit verfügen und oft von sich aus notwendige therapeutische Schritte einleiten, wie bei Pat. 8 (US) zu sehen ist. Dies ist sicher ein weiterer Grund, weshalb die Beurteilung der Ergebnisse bei chronischem Krankheitsverlauf schwieriger ist.

V.F Einfluß der Acimethin®-Therapie

Zu den internationalen Therapieempfehlungen bei chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen gehört u.a. eine Dauerprophylaxe mit L-Methionin (Acimethin®), um Rezidiven und Infektsteinbildung vorzubeugen (Fünfstück et al., 2003). Obwohl Fünfstück und Mitarbeiter zeigen konnten, daß Acimethin® zu einer signifikanten Reduktion der Zytoadhärenz von *E. coli* an Uroepithelzellen führt, ist dennoch unklar inwieweit adhärenzvermittelnde Virulenzfaktoren von *E. coli* im Harntrakt und auch schon früher durch die Medikation per os im Darmtrakt beeinflusst werden oder inwieweit andere Mechanismen und Wechselwirkungen eine Rolle spielen (Fünfstück et al., 1997). Die Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Fünfstück ergaben, daß in ihrem Patientengut (Frauen nach akuter HWI) keine erneuten Infektionen unter

Acimethin®-Metaphylaxe auftraten. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Brauchle (2002) und Maibaum (2003) wurden jedoch die wenigen neuerlichen Infektionen im Vergleich zu einer Vielzahl an Infektionen vor Acimethin®-Gabe (Fünfstück et al., 1997) fast ausschließlich bei Patienten unter Acimethin®-Therapie beobachtet. Dieser Umstand darf aber aufgrund fehlender Untersuchungen zur Wirkweise des Medikamentes auf *E. coli* und aufgrund des unterschiedlichen Patientengutes nicht als aussagekräftig gewertet werden. Es scheint so, als ob der Effekt einer Prophylaxe auch von der Art der Harnwegsinfektion abhängt. Eine Therapie mit L-Methionin stellt eben nur einen Pfeiler eines multimodalen Behandlungskonzeptes dar und *E. coli* findet offenbar v.a. bei chronischen Infektionen Wege sich trotz Metaphylaxe zu vermehren bzw. auszubreiten.

In allen drei Arbeiten aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie (IMI) konnte gezeigt werden, daß die Pathogenitätsfaktoren seltener innerhalb der Stuhlklone unter einer Acimethin®-Therapie zu finden sind, mit Ausnahme des Genclusters *hly* und *kpsMT III* in dieser Arbeit. Auch innerhalb der Urinklone sind alle Pathogenitätsfaktoren zum Teil deutlich seltener unter Acimethin®-Prophylaxe zu finden, wieder mit der Ausnahme des Kapselgenes *kpsMT III*, das im angesäuerten Urin am häufigsten nachweisbar ist. Bezüglich dieser Kapselart darf man folglich vermuten, daß die Wirkung des Medikamentes diesen Pathogenitätsfaktor eher fördert. Das vermehrte Auftreten von α -Hämolyisin innerhalb der Stuhlklone unter Therapie wurde in keiner der Vorarbeiten so gefunden und ist möglicherweise Ausdruck eines geringen Einflusses des Medikamentes auf die α -Hämolyisin-Expression.

Bei Betrachtung der Abbildung IV.57 ist ein klarer Trend für eine Reduktion von Pathogenitätsfaktoren unter einer prophylaktischen Gabe von L-Methionin zu erkennen, sowohl innerhalb der Stuhl- wie auch innerhalb der Urinklone. Da geringere Zahlen an Pathogenitätsfaktoren eine verminderte Virulenz der Keime bedingen, dürfte mit einer insgesamt geringeren Infektionsrate unter einer solchen Prophylaxe gerechnet werden. Außerdem erscheint nach dieser Datenlage eine Beeinflussung von *E. coli* durch L-Methionin bereits im Darmtrakt möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen eher die gängige Praxis einer Gabe von L-Methionin zur Vorbeugung von rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Zum Einfluß von Acimethin® gibt es allerdings noch einigen Forschungsbedarf, um alle offenen Fragen zu klären.

VI. Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen (HWI) gehören zu den häufigsten bakteriell bedingten Erkrankungen; vor allem Frauen sind sehr häufig betroffen. Harnwegsinfektionen kommt große medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung zu. Bei akuten unkomplizierten Infekten ist allein *Escherichia coli* in über 70 % der Fälle die Ursache. Auch bei komplizierten chronischen Infektionen spielt *Escherichia coli* in über 40 % aller Fälle eine große Rolle.

E. coli Stämme, die die Nieren und ableitenden Harnwege inklusive Harnblase infizieren, werden als uropathogene E. coli (UPEC) bezeichnet. Sie unterscheiden sich von anderen, apathogenen *E. coli* Stämmen dadurch, daß sie bestimmte Virulenzfaktoren (VF) und Fitnessfaktoren besitzen, die ihnen besondere Virulenz verleihen. Solche Virulenzfaktoren sind vor allem Kapseln, Adhäsine, Toxine und Eisenaufnahmesysteme.

In dieser Arbeit wurden Stuhl- und Urinproben von acht Patientinnen untersucht, die in der nephrologischen Abteilung der Universitätsklinik Jena betreut wurden und alle an chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden. Die gewonnenen Isolate wurden mittels Multiplex-PCR auf Virulenzfaktoren getestet, die für UPEC typisch sind. Des Weiteren wurden mit Hilfe der „Repetitive Extragenic Palindromic“ (Rep)-PCR und den Ergebnissen aus der Multiplex-PCR-Analyse Klone definiert. Ausgewählte Isolate wurden mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) untersucht. Die Rep-PCR- und PFGE-Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten (L. Brauchle, 2002 und M. Maibaum, 2003) wurden in diese Arbeit mit integriert und nomenklatorisch angeglichen. Die 167 Stuhl- und 186 Urinisolat dieser Arbeit konnten 81 Stuhl- und 64 Urinklonen zugeordnet werden.

In der vorliegenden Studie scheinen die Häufigkeiten UPEC-typischer Virulenzfaktoren nach längerer chronischer Harnwegsinfektion wieder etwas anzusteigen. Insbesondere aber nahmen die Häufigkeiten der Virulenzfaktoren innerhalb der Stuhlstämmen zu und entsprachen oftmals nahezu den Häufigkeiten bei Urinstämmen. Kapselgene, die bei Urinstämmen deutlich häufiger gefunden wurden, scheinen bei Chronizität eine Rolle zu spielen. Auch innerhalb der Urinklone häufiger zu finden waren die für Hämolyse, P-Fimbrien, S- bzw. F1C-Fimbrien codierenden Gencluster.

Als Erregerreservoir scheint auch bei chronischen Harnwegsinfektionen der Darm festzustehen. Im Gesamtstudienzeitraum von 38 Monaten (1997-2000) koexistierten 18 Stämme in Stuhl und Urin gleichzeitig. Zehn dieser Koexistenzen wurden nochmals zu anderen Zeitpunkten gefunden (Persistenzen).

Über den Vergleich der PFGE-Muster von Stuhl- und Urinklonen konnten bei Probandin Pat. 2 (HF) Klone mit dem PFGE-Muster IV und XV identifiziert werden, deren Bandenmuster sich so ähnlich sind (nur ein einziger Bandenshift), daß hier vermutlich eine DNA-Umlagerung stattgefunden hat.

Innerhalb von 51 Untersuchungsterminen konnte lediglich vier Mal eine akute Exazerbation erfaßt werden. Tendenziell läßt sich über den gesamten Studienzeitraum ein Rückgang an erneuten Ausbrüchen bei ähnlicher Verteilung des Virulenzfaktorspektrums in den gefundenen Stuhl- und Urinstämmen beobachten.

Eine prophylaktische Gabe von L-Methionin (Acimethin®) verminderte die Häufigkeit der untersuchten Virulenzfaktoren innerhalb der Stuhlstämmen, kann aber bei chronischen Harnwegsinfektionen eine Exazerbation nicht sicher verhindern, möglicherweise jedoch deren Anzahl verringern.

VII. Literaturverzeichnis

Agace W., Connell H., Svanborg C., 1996. Host resistance to urinary tract infection. **IN:** Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Mobley H.L., Warren T.), American Society for Microbiology Press, S. 221-243.

Ahrens R., Ott M., Ritter A., Hoschützky H., Buhler T., Lottspeich F., Boulnois G.J., Jann K., Hacker J., 1993. Genetic analysis of the gene cluster encoding nonfimbrial adhesin I from an *Escherichia coli* uropathogen. **IN:** Infect. Immun., Bd. 61: S. 2505-2512.

Alken P., Walz P.H., 1998. Urologie, Verlag Chapman & Hall.

Bauer H.W., Alloussi Sch., Egger G., Blümlein H.-M., Cozma G., Schulman C.C., 2005. A long-term multicenter, double-blinded study of an *E. coli* extract (OM-89) in female patients with recurrent UTIs. **IN:** European Urology, Bd. 47: S. 542-548.

Bast E., 2001. Mikrobiologische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag.

Berger H., Hacker J., Juarez A., Hughes C., Goebel W., 1982. Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and Mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 152: S. 1241-1247.

Bethesda Research Laboratories, 1986. Dh5 α .

Birren B.W., Lai E., Clark S.M., Hood L., Simon M.I., 1988. Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. **IN:** Nucleic. Acids. Res., Bd. 16(15): S. 7563-7582.

Blomfield I.C., 2001. The regulation of *pap* and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. **IN:** Adv. Microb. Physiol., Bd. 45: S. 1-49.

Blum G., Ott M., Lischewski A., Ritter A., Imrich H., Tschäpe H., Hacker J., 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. **IN:** Infect. Immun., Bd. 62: S. 606-614.

Boyer H.W., Roulland-Dussoix D., 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **IN:** J. Mol. Biol., Bd. 41(3): S. 459-472.

Brauchle, Lioba, 2002. Dissertation: Molekulare Untersuchungen zum Vorkommen von Pathogenitätsfaktoren bei *Escherichia coli* Isolaten aus Stuhl und Urin von Frauen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Universitätsbibliothek Würzburg, Signatur: X 118455.

Carniel E., Guilvout I., Prentice H., 1996. Characterization of a large chromosomal „high-pathogenicity island“ in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 178: S. 6743-6751.

Classen M., Diehl V., Kochsiek K., 1998. Innere Medizin, Verlag Urban & Schwarzenberg.

Crosa J.H., 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. **IN:** Microbiol. Rev., Bd. 53: S. 517-530.

De Lorenzo V., Bindereif A., Paw B.H., Neilands J.B., 1986. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 165: S. 570-578.

De Ryke J., Mazars P., Nougayrede J.P., Tasca C., Boury M., Herault F., Valette A., Oswald E., 1996. Mitotic block and delayed lethality in HeLa epithelial cells exposed to *Escherichia coli* BM2-1 producing cytotoxic necrotizing factor type 1. **IN:** Infect. Immun., Bd. 64: S. 1694-1705.

Dobrindt U., Blum-Oehler G., Nagy G., Schneider G., Johann A., Gottschalk G., Hacker J., 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I₅₃₆ to PAI IV₅₃₆) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **IN:** Infect. Immun., Bd. 70: S. 6365-6372.

Donnenberg M.S., Welch R.A., 1996. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. **IN:** Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Moblely H.L., Warren T.), American Society for Microbiology Press, S. 29-66.

Evans D.J., Evans D.G., Young L.S., Pitt J., 1980. Hemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition of seven hemagglutination types. **IN:** J. Clin. Microbiol., Bd. 12: S. 235–242.

Falzano L., Fiorentini C., Donelli G., Michel E., Kocks C., Cossart P., Cabanié L., Oswald E., Boquet P., 1993. Induction of phagocytic behaviour in human epithel cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. **IN:** Mol. Microbiol., Bd. 9: S. 1247-1254.

Fiorentini C., Donelli G., Matarrese P., Fabbri A., Paradisi S., Bouquet P., 1995. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase. **IN:** Infect. Immun., Bd. 63: S. 3936-3944.

Flatau G., Lemichez E., Gauthier M., Chardin P., Paris S., Fiorentini C., Boquet P., 1997. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. **IN:** Nature, Bd. 387: S. 729-733.

Foxman B., Zhang L., Palin K., Tallman P., Marrs C.F., 1995a. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 171: S. 1514-1521.

Foxman B., Zhang L., Tallman P., Palin K., Rode C., Bloch C., Gillespie B., Marrs G.F., 1995b. Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 172: S. 1536-1541.

Friman V., Adlerberth I., Connell H., Svanborg C., Hanson L.A., Wold A.E., 1996. Decreased expression of mannose-specific adhesins by *Escherichia coli* in the colonic microflora of immunoglobulin A-deficient individuals. **IN:** Infect. Immun., Bd. 64: S. 2794-2798.

Fünfstück R., Stein G., Naber K.G., Hacker J. und Marget W., 2003. Nephrologie - Teil 3 - Harnwegsinfektionen. **IN:** Med. Klin., Bd. 98: S. 377-387.

Fünfstück R., Straube E., Schildbach O., Tietz U., 1997. Reinfektionsprophylaxe b. Pat. mit einer rezidivierenden Harnwegsinfektion. **IN:** Med. Klin., Bd. 92: S. 574-581.

Gally D.L., Bogan J.A., Eisenstein B.I., Blomfield I.C., 1993. Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 175: S.6186-6193.

Gassen H.G., Schrimpf G., 1999. Gentechn. Methoden, Spektrum Akadem. Verlag.

Guyer M.S., Reed R.R., Steitz J.A., Low K.B., 1981. Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. **IN:** Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Bd. 45: S. 135-140.

- Hacker J., 1992.** Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. **IN:** Can. J. Microbiol., Bd. 38: S. 720-727.
- Hacker J., Bender L., Ott M., Wingender J., Lund B., Marre R., Goebel W., 1990.** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vivo* and *in vitro* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **IN:** Microb. Pathogen., Bd. 8: S. 213-225.
- Hacker J., Blum-Oehler G., Janke B., Nagy G., Goebel W., 1999.** Pathogenicity islands of extraintestinal *E. coli*. **IN:** Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements (Kaper J.B., Hacker J.). American Society for Microbiology Press, S. 59-76.
- Hacker J., Blum-Oehler G., Mühldorfer I., Tschäpe H., 1997.** Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. **IN:** Mol. Microbiol., Bd. 23(6): S. 1089-1097.
- Hacker J., Kaper J.B., 1999.** The concept of pathogenicity islands. **IN:** Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements (Kaper J.B., Hacker J.). American Society for Microbiology Press, S. 1-12.
- Hacker J., Kaper J.B., 2002.** Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes. **IN:** Springer-Verlag. **ISBN-13:** 978-3540426813.
- Hacker J., Kester H., Hochschützky H., Jann K., Lottspeich F., Korhonen T.K., 1993.** Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. **IN:** Infect. Immun., Bd. 61: S. 544-550.
- Hacker J., Knapp S., Goebel W., 1983.** Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 154(3): S. 1145-1152.
- Hacker J., Morschhäuser J., 1994.** S and F1C fimbriae. **IN:** Fimbriae Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines. (Klemm, P.), CRC Press, Kap. 2, S. 27-36.
- Heesemann J., Handtke K., Vocke T., Saken E., Rakin A., Stojiljkovic I., Berner R., 1993.** Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65000 Da and pesticine sensitivity. **IN:** Mol. Microbiol., Bd. 3: S. 397-408.
- Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H., 1997.** Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **IN:** Biotechniques, Bd. 23(3): S. 504-511.

- Herias M.V., Midtvedt T., Hanson L.A., Wold A.E., 1997.** *Escherichia coli* K5 capsule expression enhances colonization of the large intestine in the gnotobiotic rat. **IN:** Infect. Immun., Bd. 65: S. 531-536.
- Herold G., 2001.** Innere Medizin, Eigenverlag.
- Howell A.B., 2002.** Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. **IN:** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Bd. 42 (Supplement): S. 273-278.
- Huang S.H., Chen Y.H., Kong G., Chen S.H., Besemer J., Borodovsky M., Jong A., 2001.** A novel genetic island of meningitic *E. coli* K1 containing the *ibeA* invasion gene (GimA): functional annotation and carbon-source-regulated invasion of human brain microvascular endothelial cells. **IN:** Funct. Integr. Genomics, Bd. 1: S. 312-322.
- Huang S.H., Wass C., Fu Q., Prasadarao N.V., Stins M., 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*. **IN:** Infect. Immun., Bd. 63(11): S. 4470-4475.
- Hull R.A., Gill R.E., Hsu P., Minshew B.H., Falkow S., 1981.** Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *E. coli* isolate. **IN:** Infect. Immun., Bd. 33(3): S. 933-938.
- Inouye S., Sunshine M.G., Six E.W., Inouye M., 1991.** Retronphage ϕ R73: an *E. coli* phage that contains a retroelement and integrates into a tRNA gene. **IN:** Science, Bd. 252: S. 969-971.
- Jann K., Jann B., 1992.** Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. **IN:** Can. J. Microbiol., Bd. 38(7): S. 705-710.
- Jarrar K., Boedeker R.H., Weidner W., 1996.** Struvite stones: long term follow up under metaphylaxis. **IN:** Ann. Urol. (Paris), Bd. 30(3): S. 112-117.
- Johanson I., Lindstedt R., Svanborg C., 1992.** Roles of the *pap*- and *prs*-encoded adhesins in *Escherichia coli* adherence to human uroepithelial cells. **IN:** Infect. Immun., Bd. 60(8): S. 3416-3422.
- Johanson I.M., Plos K., Marklund B.I., Svanborg C., 1993.** *Pap*, *papG* and *prsG* DNA sequences in *Escherichia coli* from the fecal flora and the urinary tract. **IN:** Microb. Pathogen., Bd. 15(2): S. 121-129.
- Johnson C.C., 1991b.** Definitions, classification, and clinical presentation of urinary tract infections. **IN:** Med. Clin. North. Am., Bd. 75(2): S. 241-252.

Johnson J.R., 1991a. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **IN:** Clin. Microbiol. Rev., Bd. 4: S. 80-128.

Johnson J.R., 1997. Urinary tract infection. **IN:** *Escherichia coli: Mechanisms of virulence* (Sussman M.), Cambridge University Press, S. 495-549.

Johnson J.R., Brown J.J., 1996. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant *papG* genes encoding the Gal(alpha 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 173(4): S: 920-926.

Johnson J.R., Brown J.J., Carlino U.B., Russo T.A., 1998. Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 177(4): S. 1120-1124.

Johnson J.R., Delavari P., Stell A.L., Whittam T.S., Carlino U., Russo T.A., 2001. Molecular comparison of extraintestinal *E. coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 183(1): S. 154-9.

Johnson J.R., Stell A.L., 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 181(1): S. 261-272.

Jones C.H., Dodson K., Hultgren S.J., 1996. Structure, function and assembly of adhesive P pili. **IN:** Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Moblely H.L., Warren T.), American Society for Microbiology Press, S. 175-219.

Jones G.W., Rutter J.M., 1974. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. **IN:** J. Gen. Microbiol., Bd. 84(1): S. 135-144.

Karlsson K.A., 1989. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. **IN:** Ann. Rev. Biochem., Bd. 58: S. 309-350.

Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M., 1998. Medizinische Mikrobiologie, Thieme Verlag.

Korhonen T.K., Valtonen M.V., Parkkinen J., Vaisanen-Rhen V., Finne J., Orskov F., Orskov I., Svenson S.B., Makela P.H., 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. **IN:** Infect. Immun., Bd. 48(2): S. 486-491.

- Korhonen T.K., Westerlund-Wikström B., Virkola R., Lång H., Lähteenmäki K., Kukkonen M., Tarkkanen A.M., Pouttu R., Saarela S., Savolainen K., Tanskanen J., Hynönen U., Sillanpää J., 1997.** Host interactions of enterobacterial adhesive complexes. **IN:** Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte (Fünfstück R., Straube E., Stein G.), Pabst Science Publishers, S. 99-106.
- Kuhnert P., Hacker J., Mühldorfer I., Burnens A.P., Nicolet J., Frey J., 1997.** Detection system for *E. coli* specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. **IN:** Appl. Environ. Microbiol., Bd. 63(2): S. 703-709.
- Langermann S., Ballou W.R., 2001.** Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *E. coli* UTIs. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 183 (Supplement 1): S. 84-86.
- Le Bouguenec C., Archambaud M., Labigne A., 1992.** Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **IN:** J. Clin. Microbiol., Bd. 30(5): S. 1189-1193.
- Lomberg H., De Man P., Svanborg-Eden C., 1989.** Bacterial and host determinants of renal scarring. **IN:** APMIS, Bd. 97(3): S. 193-199.
- Ludwig A., Goebel W., 1997.** Haemolysins of *Escherichia coli*. **IN:** *Escherichia coli*: Mechanisms of virulence (Sussman M.), Cambridge University Press, S. 281-329.
- Maibaum, Maria, 2003.** Dissertation: Molekulargenetische Untersuchungen zur Persistenz und Genomvariabilität von *Escherichia coli* Isolaten von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Universitätsbibliothek Würzburg, Signatur: X 118762.
- Marrs C.F., Zhang L., Foxman B., 2005.** *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes. **IN:** FEMS Microbiol. Lett., Bd. 252: S. 183-190.
- Measley R.E., Levison M.E., 1991.** Host defense mechanisms in the pathogenesis of urinary tract infection. **IN:** Med. Clin. North. Am., Bd. 75(2): S. 275-286.
- Morschhäuser J., Vetter V., Emödy L., Hacker J., 1994.** Adhesin regulatory genes within large, unstable DNA regions of pathogenic *Escherichia coli*: cross-talk between different adhesin gene clusters. **IN:** Mol. Microbiol., Bd. 11(3): S. 555-566.
- Mühldorfer I., Hacker J., 1994.** Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. **IN:** Microb. Pathogen., Bd. 16(3): S. 171-181.

- Mühldorfer I., Ziebuhr W., Hacker J., 1999.** *E. coli* in urinary tract infections. **IN:** Molecular Medical Microbiology (Sussman, M.), Academic Press, S. 1515-1540.
- Neilands J.B., 1992.** Mechanisms and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30). **IN:** Can. J. Microbiol., Bd. 38(7): S. 728-733.
- Neilands J.B., 1995.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **IN:** J. Biol. Chem., Bd. 270(45): S. 26723-26726.
- Orskov I., Orskov F., 1983.** Serology of *Escherichia coli* fimbriae. **IN:** Prog. Allergy, Bd. 33: S. 80-105.
- Ott M., Hoschützky H., Jann K., Van Die I., Hacker J., 1988.** Gene clusters for S fimbrial adhesin (sfa) and F1C fimbriae (foc) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 170(9): S. 3983–3990.
- Parkkinen J., Hacker J., Korhonen T.K., 1991.** Acceleration of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by *E. coli* S fimbriae associated with neonatal septicaemia and meningitis. **IN:** Thromb. Haemost., Bd. 65(5): S. 483-486.
- Plos K., Carter T., Hull S., Hull R., Svanborg-Eden C., 1990.** Frequency and organization of pap homologous DNA in relation to clinical origin of uropathogenic *Escherichia coli*. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 161(3): S. 518-524.
- Plos K., Connell H., Jodal U., Marklund B.I., Mårild S, Wettergren B., Svanborg C., 1995.** Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 171(3): S. 625–631.
- Pschyrembel, 2002.** Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage, Verlag de Gruyter.
- Renz-Polster H., Braun J., 2001.** Lehrbuch Innere Medizin, Verlag Urban & Fischer.
- Russo T.A., Stapleton A., Wenderoth S., Hooton T.M., Stamm W.E., 1995.** Chromosomal restriction fragment polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 172(2): S. 440-445.
- Russo T.A., Beanan J.M., Olson R., Genagon S.A., MacDonald U., Cope J.J., Davidson B.A., Johnston B., Johnson J.R., 2007.** A killed, genetically engineered derivative of a wild-type extraintestinal pathogenic *E. coli* strain is a vaccine candidate. **IN :** Vaccine, Bd. 25 : S. 3859-3870.

- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **IN:** Science, Bd. 239(4839): S. 487-491.
- Sambrook J., et al., 1989.** Molecular Cloning - Laboratory Manuals (Volume 1-3, 2nd Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt H., Hensel M., 2004.** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **IN:** Clin. Microbiol. Rev., Bd. 17: S. 14-56.
- Schmidt H., Hensel M., 2004.** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **IN:** Clin. Microbiol. Rev., Bd. 17(1): S. 14-56.
- Schubert S., Rakin A., Fischer D., Sorsa J., Heesemann J., 1999.** Characterization of the integration site of Yersinia high-pathogenicity island in *Escherichia coli*. **IN:** FEMS Microbiol. Lett., Bd. 179: S. 409-414.
- Schubert S., Rakin A., Karch H., Carniel E., Heesemann J., 1998.** Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **IN:** Infect. Immun., Bd. 66(2): S. 480-485.
- Schwartz D.C., Cantor C.R., 1984.** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **IN:** Cell, Bd. 37(1): S. 67-75.
- Sobel J.D., 1991.** Bacterial etiologic agents in the pathogenesis of urinary tract infection. **IN:** Med. Clin. North. Am., Bd. 75(2): S. 253-273.
- Sobel J.D., Kaye D., 1985.** Reduced uromucoid excretion in the elderly. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 152(3): S. 653 ff.
- Sokurenko E.V., Chesnokova V., Dykhuizen D.E., Ofek I., Wu X.R., Krogfelt K.A., Struve C., Schembri M.A., Hasty D.L., 1998.** Pathogenic adaptation of *E. coli* by natural variation of the FimH adhesin. **IN:** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 95(15): S. 8922-8926.
- Stapleton A., Hooton T.M., Fennell C., Roberts P.L., Stamm W.E., 1995.** Effect of secretor status on vaginal and rectal colonization with fimbriated *Escherichia coli* in women with and without recurrent urinary tract infection. **IN:** J. Infect. Dis., Bd. 171(3): S. 717-720.
- Sun J., Inouye M., Inouye S., 1991.** Association of a retroelement with a P4-like cryptic prophage (retronphage ϕ R73) integrated into the selenocystyl tRNA gene of *Escherichia coli*. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 173(13): S. 4171-4181.

- Svanborg C., Orskov F., Orskov I., 1994.** Fimbriae and disease. **IN:** Fimbriae Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines. (Klemm, P.), CRC Press, S. 239-254.
- Swenson D.L., Bukanov N.O., Berg D.E., Welch R.A., 1996.** Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. **IN:** Infect. Immun., Bd. 64(9): S. 3736-3743.
- Thomas L., 2000.** Labor und Diagnose. Verlag TH-Books Frankfurt a.M.
- Topley N., Steadman R., Mackenzie R., Knowlden J.M., Williams J.D., 1989.** Type 1 fimbriate strains of *Escherichia coli* initiate renal parenchymal scarring. **IN:** Kidney Int., Bd. 36(4): S. 609-616.
- Van Die I., Hoekstra W., Bergmans H., 1987.** Analysis of the primary structure of P-fimbrillins of uropathogenic *E. coli*. **IN:** Microb. Pathog., Bd. 3(3): S. 149-154.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R., 1991.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **IN:** Nucleic. Acids. Res., Bd. 19(24): S. 6823-6831.
- Virkola R., Parkkinen J., Hacker J., Korhonen T.K., 1993.** Sialyloligosaccharide chains of laminin as an extracellular matrix target for S fimbriae of *Escherichia coli*. **IN:** Infect. Immun., Bd. 61(10): S. 4480-4484.
- Warren J., Mobley H., Hebel J., Triffilis A., 1995.** Cytolethality of hemolytic *Escherichia coli* to primary human renal proximal tubular cell cultures obtained from different donors. **IN:** Urology, Bd. 45(4): S. 706-710.
- Warren J.W., 1996.** Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. **IN:** Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management (Mobley H.L., Warren T.), American Society for Microbiology Press, S. 3-27.
- Welch R.A., 1991.** Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. **IN:** Mol. Microbiol., Bd. 5(3): S. 521-528.
- Welch R.A., Forestier C., Lobo A., Pellet S., Thomas W., Rowe G., 1992.** The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins. **IN:** FEMS Microbiol. Immunol., Bd. 5(1-3): S. 29-36.
- Westerlund B., Korhonen T.K., 1993.** Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. **IN:** Mol. Microbiol., Bd. 9(4): S. 687-694.

- Woods C.R., Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R., 1993.** Whole-cell repetitive element sequence-based PCR allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. **IN:** J. Clin. Microbiol., Bd. 31(7): S. 1927-1931.
- Xia Y., Gally D., Forsman-Semb K., Uhlin B.E., 2000.** Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. **IN:** EMBO J., Bd. 19: S. 1450-1457.
- Yamamoto S., Terai A., Yuri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O., 1995.** Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **IN:** FEMS Immunol. Med. Microbiol., Bd. 12(2): S. 85-90.
- Zafirri D., Ofek I., Adar R., Pocino M., Sharon N., 1989.** Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. **IN:** Antimicrob. Agents. Chemother., Bd. 33(1): S. 92-98.
- Zangwill D.P., Porter P.J., Kaitz A.L., Cotran R.S., Bodel P.T., Kass E.H., 1962.** Antibacterial organic acids in chronic urinary tract infection. Use in long-term management. **IN:** Arch. Intern. Med., Bd. 110: S. 801-817.
- Zapata G., Crowley J.M., Vann W.F., 1992.** Sequence and expression of the *Escherichia coli* K1 *neuC* gene product. **IN:** J. Bacteriol., Bd. 174(1): S. 315-319.
- Zapata G., Vann W.F., Aaronson W., Lewis M.S., Moos M., 1989.** Sequence of the cloned *E. coli* K1 CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase gene. **IN:** J. Biol. Chem., Bd. 264(25): S. 14769-14774.

VIII. Anhang

VIII. Anhang

Tabelle VIII.1: Pat. 1 (CB)
Ergebnisse von L. Brauchle (2002)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
18.04.97	82	1A1	1	I
	83	1A2	1	
	84	1A3	1	
	85	1A4	1	
	86	1A5	1	
	87	1A6	1	
11.06.97	64	1B1	2	II
	65	1B2	2	
	66	1B3	3	III
	67	1B4	4	IV
	68	1B5	4	V
	69	1B6	3	
18.06.97	46	1C1	5	VI
	47	1C2	5	
	48	1C3	5	
	49	1C4	5	
	50	1C5	5	
	51	1C6	5	
16.07.97	153	1D1	6	VII
	154	1D2	7	VIII
	155	1D3	7	
	156	1D4	7	
	157	1D5	8	IX
	158	1D6	7	
27.08.97	255	1E1	9	X
	256	1E2	10	XI
	257	1E3	9	
	258	1E4	9	
	259	1E5	10	XI
	260	1E6	9	
	289	1E3U	9	
	290	1E4U	9	
05.11.97	503	1F1	10	XII
	504	1F2	10	XII
	505	1F3	11	n.a.
	506	1F4	10	XII
	507	1F5	10	XII
	508	1F6	10	XII
	509	1F1U	12	XIII
	510	1F2U	12	

Tabelle VIII.2: Pat. 1 (CB)
Ergebnisse von M. Maibaum (2003)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
21.01.98	580	1G1	13	XIV
	581	1G2	13	
	582	1G3	13	
	583	1G4	13	XIV
	584	1G5	13	
	585	1G6	13	
	587	1G1U	12	XIII
	588	1G2U	12	XIII
	589	1G3U	12	
	590	1G4U	12	
	591	1G5U	12	XIII
	592	1G6U	12	XIII
01.04.98	705	1H1	12	XIII
	706	1H2	14	XV
	707	1H3	14	XV
	708	1H4	12	
	709	1H5	12	XIII
	710	1H6	12	
	712	1H1U	15	XIII
	713	1H2U	15	
	714	1H3U	15	
	715	1H4U	15	XIII
716	1H5U	15		
717	1H6U	15		
17.07.98	821	1I1U	15	
	822	1I2U	15	
	823	1I3U	15	XIII
	824	1I4U	15	
	825	1I5U	15	
	826	1I6U	15	
	827	1I7U	15	XIII
	828	1I8U	15	XIII
	829	1I1	16	XIII
	830	1I2	15	
	831	1I3	15	XIII
832	1I4	15		
833	1I5	15		
08.10.98	987	1K1	17	XVI
	988	1K2	17	
	989	1K3	17	XVII
	990	1K4	17	
	991	1K5	18	XVIII
	992	1K6	18	XVIII
	994	1K1U	19	
	995	1K2U	19	XVI
	996	1K3U	19	
	997	1K4U	20	XIX
	998	1K5U	20	XX
	999	1K6U	19	XXI

Tabelle VIII.3: Pat. 1 (CB) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	<i>hlyA</i>	Pap/Prs	<i>papA</i>	<i>papC</i>	<i>papEF</i>	<i>papG</i> Allel I	<i>papG</i> Allel III	<i>Sfa</i>	<i>sfa/focDE</i>	Fim	<i>fimH</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>nfaE</i>	<i>ibeA</i>	<i>bmaE</i>	<i>rfc</i>
16.12.98	1164	1L1	1KL1	21	XXII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1165	1L2	1KL1	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1166	1L3	1KL1	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1167	1L4	1KL1	21		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1168	1L5	1KL1	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1169	1L6	1KL1	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1171	1L1U	1KL2	22	XXIII	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	1172	1L2U	1KL2	22		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	1173	1L3U	1KL2	22		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	1174	1L4U	1KL2	22		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	1175	1L5U	1KL2	22		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	1176	1L6U	1KL2	22		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
23.03.99	2071	1M1U	1KL3	23	XXIV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
	2072	1M2U	1KL4	24	XXIV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	2073	1M3U	1KL4	24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	2074	1M4U	1KL4	24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	2075	1M5U	1KL4	24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	2076	1M6U	1KL4	24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	2077	1M1	1KL5	25	XXV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
	2078	1M2	1KL5	25		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
	2079	1M3	1KL6	25		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	2080	1M4	1KL5	25		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
	2081	1M5	1KL5	25		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
	2082	1M6	1KL5	25		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
14.07.99	1348	1N1	1KL7	26	XXVI	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	1349	1N2	1KL8	26		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	1350	1N3	1KL9	26		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	1351	1N4	1KL7	26		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	1352	1N5	1KL10	26		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
13.10.99	1519	1O1U	1KL11	27	XXVII	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	1520	1O2U	1KL11	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	1521	1O3U	1KL11	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	1522	1O4U	1KL12	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	1523	1O5U	1KL13	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	1525	1O1	1KL11	27	XXVII	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	1526	1O2	1KL14	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1527	1O3	1KL14	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1528	1O4	1KL14	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1529	1O5	1KL14	27		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
08.12.99	1739	1P1U	1KL15	28	XVI	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	1740	1P2U	1KL17	29	XVIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1741	1P3U	1KL17	29		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1742	1P4U	1KL17	29		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1743	1P5U	1KL17	29		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1745	1P1	1KL16	28	XXVII	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1746	1P2	1KL15	28		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1747	1P3	1KL15	28		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1748	1P4	1KL17	29	XVIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	1749	1P5	1KL16	28		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
22.03.00	2000	1Q1U	1KL18	30	XXIX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
	2001	1Q2U	1KL19	31	XXX	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	2002	1Q3U	1KL19	31		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	2003	1Q4U	1KL19	31		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	2004	1Q5U	1KL20	31		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
14.06.00	2057	1R1U	1KL21	32	XXXI	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2058	1R2U	1KL22	33	XXX	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	2059	1R3U	1KL22	33		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	2060	1R4U	1KL22	33		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	2062	1R1	1KL23	34		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	2063	1R2	1KL24	35		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	2064	1R3	1KL25	36		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	2065	1R4	1KL26	37		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

VIII. Anhang

Tabelle VIII.4: Pat. 2 (HF)
Ergebnisse von L. Brauchle (2002)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
27.05.97	76	2A1	1	I
	77	2A2	2	II
	78	2A3	3	III
	79	2A4	3	
	80	2A5	2	
	81	2A6	3	
03.06.97		2B		
10.06.97		2C		
17.06.97		2D		
23.07.97	183	2E1	4	IV
	184	2E2	4	
	185	2E3	4	
	186	2E4	4	
	187	2E5	4	
	188	2E6	4	
	177	2E1U	4	IV
	178	2E2U	4	IV
	179	2E3U	5	V
	182	2E6U	5	
01.10.97	328	2F1	6	VI
	329	2F2	7	VII
	330	2F3	8	VIII
	331	2F4	9	IX
	332	2F5	8	VIII
	333	2F6	10	X
07.01.98	479	2G1	4	IV
	480	2G2	4	
	481	2G3	4	
	482	2G4	4	
	483	2G5	4	
	484	2G6	4	IV
	467	2G1U	11	n.a.
	468	2G1U	11	

Tabelle VIII.5: Pat. 2 (HF)
Ergebnisse von M. Maibaum (2003)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
08.04.98	769	2H1U	11	n.a.
	770	2H2U	11	
	771	2H3U	11	
	772	2H4U	11	
	773	2H5U	11	n.a.
	774	2H6U	11	
17.07.98	845	2I1U	11	n.a.
	846	2I2U	11	
	847	2I3U	11	
	848	2I4U	11	n.a.
	849	2I5U	11	
	850	2I6U	11	n.a.
	851	2I1	12	XI
	852	2I2	12	
	853	2I3	12	XI
	854	2I4	12	
	855	2I5	13	XI
	856	2I6	13	XI
21.10.98	1001	2K1	14	XII
	1002	2K2	15	XIII
	1003	2K3	15	XIII
	1004	2K4	15	
	1005	2K5	16	XI
	1006	2K6	16	XI
	1008	2K1U	17	n.a.
	1009	2K2U	17	
	1010	2K3U	17	XIV
	1011	2K4U	17	
	1012	2K5U	17	
	1013	2K6U	17	

Tabelle VIII.6: Pat. 2 (HF) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	<i>hlyA</i>	Pap/Prs	<i>papA</i>	<i>papC</i>	<i>papEF</i>	<i>papG</i> Allel I	<i>papG</i> Allel III	Sfa	<i>sfa/focDE</i>	Fim	<i>fimH</i>	K1	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> III	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	PAI	<i>ntaE</i>	<i>ibeA</i>	<i>bmaE</i>	<i>rfc</i>
16.12.98	1150	2L1	2KL3	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1151	2L2	2KL1	14	XII	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1152	2L3	2KL4	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1153	2L4	2KL10	19	IV	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1154	2L5	2KL4	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1155	2L6	2KL5	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1157	2L1U	2KL6	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1158	2L2U	2KL6	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1159	2L3U	2KL5	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1160	2L4U	2KL7	18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1161	2L5U	2KL6	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1162	2L6U	2KL3	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
13.01.99	1199	2M1	2KL10	19	IV	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1200	2M2	2KL10	19		-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1201	2M3	2KL10	19		-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1202	2M4	2KL10	19		-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1203	2M5	2KL10	19		-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1204	2M6	2KL2	14		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
	1206	2M1U	2KL5	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1207	2M2U	2KL5	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1208	2M3U	2KL5	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1209	2M4U	2KL6	18		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1210	2M5U	2KL4	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	1211	2M6U	2KL3	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
14.04.99	2113	2N1U	2KL8	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	2114	2N2U	2KL8	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	2115	2N3U	2KL8	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	2116	2N4U	2KL8	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	2117	2N5U	2KL8	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	2118	2N6U	2KL9	18		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
21.07.99	1360	2O1U	2KL10	19	XV	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1361	2O2U	2KL10	19		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1362	2O3U	2KL10	19		-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1363	2O4U	2KL10	19		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	1364	2O5U	2KL10	19		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
10.11.99	1654	2P1U	2KL11	20	XVI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	1655	2P2U	2KL12	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	1656	2P3U	2KL12	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	1657	2P4U	2KL13	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	1658	2P5U	2KL13	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	1661	2P1	2KL14	21	XVII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1662	2P2	2KL14	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1663	2P3	2KL16	22	XVIII	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	1664	2P4	2KL15	21		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	1665	2P5	2KL15	21		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
05.01.00		2Q																									
26.01.00	2018	2R1U	2KL17	23	XIX	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2019	2R2U	2KL17	23		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2020	2R3U	2KL17	23		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2021	2R4U	2KL17	23		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2022	2R5U	2KL17	23		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
29.03.00		2S																									

VIII. Anhang

Tabelle VIII.7: Pat. 3 (CG)
Ergebnisse von L. Brauchle (2002)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
17.04.97	136	3A1	1	I
	137	3A2	1	
	138	3A3	1	
	139	3A4	1	
	140	3A5	1	
	141	3A6	1	
18.06.97	124	3B1	2	II
	125	3B2	3	III
	126	3B3	2	
	127	3B4	3	
	128	3B5	2	II
	129	3B6	4	IV
23.07.97	189	3C1	5	V
	190	3C2	5	
	191	3C3	5	
	192	3C4	5	
	193	3C5	5	
	194	3C6	5	V
	195	3C1U	5	
	196	3C2U	5	
22.10.97	416	3D1	6	VI
	417	3D2	6	
	418	3D3	6	
	419	3D4	7	VII
	420	3D5	8	VIII
	421	3D6	6	
	376	3D1U	5	
	377	3D2U	5	
30.10.97	422	3E1	9	n.a.
	423	3E2	9	
	424	3E3	9	
	425	3E4	9	
	426	3E5	9	
	427	3E6	9	
	428	3E1U	5	
	429	3E2U	5	
07.11.97		3F		
26.11.97	434	3G1	10	IX
	435	3G2	11	X
	436	3G3	6	
	437	3G4	12	XI
	438	3G5	5	
	439	3G6	5	
	440	3G1U	12	XI
	441	3G2U	12	
17.12.97	446	3H1	5	
	447	3H2	5	
	448	3H3	5	V
	449	3H4	5	
	450	3H5	5	
	451	3H6	5	

Tabelle VIII.8: Pat. 3 (CG)
Ergebnisse von M. Maibaum (2003)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
28.01.98	609	3I1	13	XII
	610	3I2	14	XIII
	611	3I3	13	XII
	612	3I4	13	
	613	3I5	14	XIII
	614	3I6	14	XIII
04.02.98	636	3K1	15	XIV
	637	3K2	5	V
	638			
	639	3K3	15	XIV
	640	3K4	15	XIV
	641	3K5	15	
12.02.98	643	3L1	5	V
	644	3L2	5	
	645	3L3	5	
	646	3L4	5	
	647	3L5	5	
	648	3L6	5	V
25.02.98	656	3M1	16	XV
	657	3M2	16	
	658	3M3	14	XIII
	659	3M4	16	XV
	660	3M5	14	XIII
	661	3M6	16	
11.03.98	747	3N1	17	XVI
	748	3N2	5	V
	749	3N3	17	XVI
	750	3N4	17	
	751	3N5	5	V
	752	3N6	5	
22.04.98	776	3O1	18	XVII
	777	3O2	5	V
	778	3O3	18	XVII
	779	3O4	5	V
	780	3O5	5	
	781	3O6	5	
	966	3O1U	5	V
	967	3O2U	5	
	968	3O3U	5	
	969	3O4U	5	
	970	3O5U	5	
	971	3O6U	5	V

Tabelle VIII.9: Pat. 3 (CG) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	hlyA	Pap/Prs	papA	papC	papEF	papG Allel I	papG Allel III	Sfa	sfa/focDE	Fim	fimH	K1	kpsMT II	kpsMT III	fyuA	iutA	PAI	nfaE	ibeA	brnA	rfaE
18.11.98	1111	3P1	3KL4	19	XVIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1112	3P2	3KL1	18	XIX	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1113	3P3	3KL2	18		+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1114	3P4	3KL5	19		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1115	3P5	3KL6	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1116	3P6	3KL3	18		+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1118	3P1U	3KL7	21	XX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1119	3P2U	3KL7	21	XX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1120	3P3U	3KL7	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1121	3P4U	3KL7	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1122	3P5U	3KL7	21		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	1123	3P6U	3KL7	21	XX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
20.01.99	1220	3Q1	3KL8	22	XIX	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1221	3Q2	3KL9	23	XXI	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
	1222	3Q3	3KL9	23		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
	1223	3Q4	3KL10	24	XXII	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1224	3Q5	3KL9	23		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
	1225	3Q6	3KL11	25		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1227	3Q1U	3KL12	26		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	1228	3Q2U	3KL12	26		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	1229	3Q3U	3KL12	26		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	1230	3Q4U	3KL12	26		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	1231	3Q5U	3KL12	26		-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	1232	3Q6U	3KL13	26	XX	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
31.03.99	2095	3R1U	3KL14	27		-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2096	3R2U	3KL15	27		-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2097	3R3U	3KL16	27		-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2098	3R4U	3KL15	27	XXIII	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2099	3R5U	3KL16	27		-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2100	3R6U	3KL15	27		-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
14.07.99	1342	3S1	3KL17	28		-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	1343	3S2	3KL18	28		-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	1344	3S3	3KL17	28	XXIV	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	1345	3S4	3KL17	28		-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	1346	3S5	3KL17	28		-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
22.09.99	1474	3T1U	3KL19	29	XXV	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1475	3T2U	3KL25	30	XXVI	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	1476	3T3U	3KL26	31		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	1477	3T4U	3KL20	29		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1478	3T5U	3KL20	29	XXV	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1480	3T1	3KL21	29	XXV	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1481	3T2	3KL22	29		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1482	3T3	3KL23	29		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	1483	3T4	3KL21	29		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1484	3T5	3KL22	29		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
08.12.99	1751	3U1U	3KL19	29	XXV	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1752	3U2U	3KL24	29		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1753	3U3U	3KL27	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	1754	3U4U	3KL27	32	XXVII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	1755	3U5U	3KL27	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	1757	3U1	3KL27	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	1758	3U2	3KL28	32	XXVII	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	1759	3U3	3KL27	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	1760	3U4	3KL27	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	1761	3U5	3KL27	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
12.04.00	2137	3V1U	3KL29	33	XXVIII	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2138	3V2U	3KL29	33		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2139	3V3U	3KL29	33		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2140	3V4U	3KL29	33		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2141	3V5U	3KL29	33		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	2142	3V6U	3KL29	33		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

VIII. Anhang

Tabelle VIII.10: Pat. 5 (EM)
Ergebnisse von L. Brauchle (2002)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
27.08.97	231	5A1	1	I
	232	5A2	2	II
	233	5A3	2	
	234	5A4	2	
	235	5A5	1	
	236	5A6	2	
	281	5A1U	3	III
	282	5A2U	4	IV
10.12.97	473	5B1	5	n.a.
	474	5B2	5	
	475	5B3	5	
	476	5B4	6	V
	477	5B5	6	
	478	5B6	5	
	521	5B1U	7	VI
	522	5B2U	7	

Tabelle VIII.11: Pat. 5 (EM)
Ergebnisse von M. Maibaum (2003)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
25.03.98	677	5C1	6	VII
	678	5C2	6	
	679	5C3	6	
	680	5C4	6	
	681	5C5	6	
	682	5C6	6	VII
	684	5C1U	7	VI
	685	5C2U	7	VI
	686	5C3U	7	VI
	687	5C4U	7	
	688	5C5U	7	
	689	5C6U	7	VI

Tabelle VIII.12: Pat 5 (EM) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	hlyA	Pap/Prs	papA	papC	papEF	papG Allel I	papG Allel III	Sfa	sfa/focDE	Fim	fimH	K1	kpsMT II	kpsMT III	fyuA	iutA	PAI	nfaE	ibeA	bmaE	rfa
19.05.99	2125	5D1U	5KL1	8	VI	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2126	5D2U	5KL1	8		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2127	5D3U	5KL1	8		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2128	5D4U	5KL1	8		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2129	5D5U	5KL1	8		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2130	5D6U	5KL1	8		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2131	5D1	5KL2	9	VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2132	5D2	5KL2	9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2133	5D3	5KL2	9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2134	5D4	5KL2	9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2135	5D5	5KL2	9		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	2136	5D6	5KL3	10	VIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.10.99	1535	5E1	5KL4	11	IX	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	1537	5E1U	5KL5	12	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
	1538	5E2U	5KL5	12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
05.01.00	1835	5F1U	5KL6	12	X	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1836	5F2U	5KL6	12		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1837	5F3U	5KL6	12		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1838	5F4U	5KL6	12		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1839	5F5U	5KL6	12		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1841	5F1	5KL5	12	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1842	5F2	5KL5	12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1843	5F3	5KL5	12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1844	5F4	5KL5	12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
	1845	5F5	5KL5	12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
19.04.00		5G																									

VIII. Anhang

Tabelle VIII.13: Pat. 8 (US)
Ergebnisse von L. Brauchle (2002)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
24.04.97	118	8A1	1	I
	119	8A2	1	
	120	8A3	1	
	121	8A4	1	
	122	8A5	1	
	123	8A6	1	
16.07.97	171	8B1	2	I
	172	8B2	1	I
	173	8B3	1	
	174	8B4	2	
	175	8B5	1	
	176	8B6	2	
15.10.97	364	8C1	3	II
	365	8C2	4	III
	366	8C3	4	
	367	8C4	5	IV
	368	8C5	6	V
	369	8C6	7	VI
	358	8C1U	7	
	359	8C2U	7	
10.12.97	491	8D1	8	V
	492	8D2	9	VII
	493	8D3	8	
	494	8D4	9	
	495	8D5	8	
	496	8D6	8	
	533	8D1U	7	
	534	8D2U	7	
23.12.97	539	8E1	10	n.a.
	540	8E2	11	VIII
	541	8E3	11	
	542	8E4	11	
	543	8E5	12	IX
	544	8E6	12	
	497	8E1U	7	
	498	8E2U	7	

Tabelle VIII.14: Pat. 8 (US)
Ergebnisse von M. Maibaum (2003)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
11.03.98	754	8F1	13	X
	755	8F2	14	XI
	756	8F3	15	n.a.
	757	8F4	16	XII
	758	8F5	13	X
	759	8F6	15	n.a.
01.10.98	953	8G1	17	XIII
	954	8G2	18	XIV
	955	8G3	18	
	956	8G4	17	
	957	8G5	17	XIII
	958	8G6	17	
	946	8G1U	18	XV
	947	8G2U	18	XV
	948	8G3U	18	
	949	8G4U	18	
	950	8G5U	18	
	951	8G6U	18	XV

Tabelle VIII.15: Pat 8 (US) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	hlyA	Pap/Prs	papA	papC	papEF	papG Allel I	papG Allel III	Sfa	sfa/focDE	Fim	fimH	K1	kpsMT II	kpsMT III	fyuA	iutA	PAI	ntaE	ibeA	bmaE	rfc	
02.12.98	1138	8H1	8KL1	19	XVI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	1139	8H2	8KL2	20	XVII	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1140	8H3	8KL2	20		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1141	8H4	8KL2	20		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1143	8H1U	8KL2	20	XVIII	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1144	8H2U	8KL2	20		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1145	8H3U	8KL2	20		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1146	8H4U	8KL2	20		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1147	8H5U	8KL2	20		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1148	8H6U	8KL2	20		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
31.03.99	2083	8I1	8KL3	20	XIV	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	
	2084	8I2	8KL4	21	XIX	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	
	2085	8I3	8KL4	21		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	
	2086	8I4	8KL2	20		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	2087	8I5	8KL2	20		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	2088	8I6	8KL2	20		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
12.05.99	2119	8K1	8KL5	22	XX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	2120	8K2	8KL5	22		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	2121	8K3	8KL5	22		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	2122	8K4	8KL5	22		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	2123	8K5	8KL5	22		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	2124	8K6	8KL5	22		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
28.07.99	1366	8L1U	8KL6	23	XXI	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
	1367	8L2U	8KL7	23	XXI	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
	1368	8L3U	8KL7	23		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
	1369	8L4U	8KL6	23		+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
	1370	8L5U	8KL7	23		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
	1372	8L1	8KL8	24	XXII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
	1373	8L2	8KL9	25	XXIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
	1374	8L3	8KL9	25		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
	1375	8L4	8KL11	26		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
	1376	8L5	8KL10	25		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
03.11.99	1619	8M1U	8KL12	27	XXIV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	
	1620	8M2U	8KL13	28		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	
	1621	8M3U	8KL14	28		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1622	8M4U	8KL14	28		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1623	8M5U	8KL14	28	XXV	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	
	1625	8M1	8KL15	29		-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	
	1626	8M2	8KL16	30		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	
	1627	8M3	8KL18	31		-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	
	1628	8M4	8KL19	32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	
	1629	8M5	8KL17	30		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	
19.01.00	1883	8N1U	8KL20	33	XXVI	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
	1884	8N2U	8KL20	33		+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
	1885	8N3U	8KL21	33	XXVI	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
	1886	8N4U	8KL20	33		+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
	1887	8N5U	8KL22	33		+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
	1889	8N1	8KL26	34	XXVI	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	1890	8N2	8KL23	33		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	
	1891	8N3	8KL24	33		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
	1892	8N4	8KL27	34		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	1893	8N5	8KL28	35		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
29.03.00	2006	8O1U	8KL25	33	XXVI	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2007	8O2U	8KL29	36	XXVI	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2008	8O3U	8KL25	33		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2009	8O4U	8KL29	36		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2010	8O5U	8KL25	33		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
21.06.00	2143	8P1U	8KL29	36	XXVI	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2144	8P2U	8KL29	36		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2145	8P3U	8KL29	36		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2146	8P4U	8KL29	36		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2147	8P5U	8KL29	36		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2148	8P6U	8KL29	36		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-

Tabelle VIII.16: Pat. 11 (SH)
Ergebnisse von L. Brauchle (2002)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
15.10.97	352	11A1	1	I
	353	11A2	1	
	354	11A3	1	
	355	11A4	1	
	356	11A5	1	
	357	11A6	1	

Tabelle VIII.17: Pat. 11 (SH)
Ergebnisse von M. Maibaum (2003)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
19.03.98	740	11B1	2	II
	741	11B2	2	
	742	11B3	2	
	743	11B4	2	
	744	11B5	2	
	745	11B6	2	II
01.07.98	857	11C1U	3	III
	858	11C2U	3	III
	859	11C3U	4	IV
	860	11C4U	4	IV
	861	11C5U	5	V
	862	11C6U	4	IV

Tabelle VIII.18: Pat. 11 (SH) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	hlyA	Pap/Prs	papA	papC	papEF	papG Allel I	papG Allel III	Sfa	sfa/focDE	Fim	fimH	K1	kpsMT II	kpsMT III	fyuA	iutA	PAI	ntaE	ibeA	bmaE	rbc
07.04.99	2101	11D1U	11KL1	6	VI	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2102	11D2U	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2103	11D3U	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2104	11D4U	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2105	11D5U	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2106	11D6U	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2107	11D1	11KL1	6	VI	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2108	11D2	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2109	11D3	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2110	11D4	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2111	11D5	11KL2	6	VI	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	2112	11D6	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
25.08.99	1408	11E1	11KL1	6	VI	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1409	11E2	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1410	11E3	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1411	11E4	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1412	11E5	11KL1	6		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
15.12.99	1787	11F1U	11KL4	7	VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	1788	11F2U	11KL4	7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	1789	11F3U	11KL4	7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	1790	11F4U	11KL4	7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	1791	11F5U	11KL3	6	VIII	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	1793	11F1	11KL3	6	VIII	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	1794	11F2	11KL4	7	VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	1795	11F3	11KL3	6		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	1796	11F4	11KL4	7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
	1797	11F5	11KL5	7	VII	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
26.04.00		11G																									

Tabelle VIII.19: Pat. 22 (IH)
Ergebnisse von M. Maibaum (2003)

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Rep	PFGE
02.10.98	960	22A1	1	I
	961	22A2	2	II
	962	22A3	1	I
	963	22A4	1	
	964	22A5	1	
	965	22A6	1	
07.10.98	973	22B1	3	III
	974	22B2	3	
	975	22B3	3	
	976	22B4	3	
	977	22B5	3	
	978	22B6	3	
	980	22B1U	3	III
	981	22B2U	2	II
	982	22B3U	2	
	983	22B4U	3	III
	984	22B5U	3	
21.10.98	1015	22C1	4	IV
	1016	22C2	5	V
	1017	22C3	5	
	1018	22C4	5	
	1019	22C5	5	
	1020	22C6	5	
	1022	22C1U	5	V
	1023	22C2U	5	
	1024	22C3U	5	
	1025	22C4U	5	
	1026	22C5U	5	
	1027	22C6U	5	

Tabelle VIII.20: Pat 22 (IH) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	hlyA	Pap/Prs	papA	papC	papEF	papG Allel I	papG Allel III	Sfa	sfa/focDE	Fim	fimH	K1	kpsMT II	kpsMT III	fyuA	iutA	PAI	ntaE	ibeA	bmaE	rfc
20.01.99	1235	22D1	22KL1	6	VI	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1236	22D2	22KL1	6		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1237	22D3	22KL1	6		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1238	22D4	22KL2	7	VII	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	1239	22D5	22KL1	6		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1240	22D6	22KL1	6		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1242	22D1U	22KL3	7	VII	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	1243	22D2U	22KL3	7		-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	1244	22D3U	22KL4	7		-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	1245	22D4U	22KL3	7		-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	1246	22D5U	22KL3	7		-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	1247	22D6U	22KL3	7		-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
	31.03.99	2089	22E1	22KL5	8	VIII	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
		2090	22E2	22KL6	8		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2091		22E3	22KL5	8		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
2092		22E4	22KL6	8		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
2093		22E5	22KL5	8		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
2094		22E6	22KL6	8		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
07.04.99		22F																									
13.04.99		22G																									
26.05.99		22H																									
13.10.99	1533	22I1	22KL7	9	IX	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
05.01.00	1847	22K1U	22KL8	10	X	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1848	22K2U	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1849	22K3U	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1850	22K4U	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1851	22K5U	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1853	22K1	22KL8	10	X	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1854	22K2	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1855	22K3	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1856	22K4	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
	1857	22K5	22KL8	10		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	
05.04.00	2030	22L1	22KL9	11	XI	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	
	2031	22L2	22KL9	11		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	
	2032	22L3	22KL9	11		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	
	2033	22L4	22KL9	11		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	
	2034	22L5	22KL9	11		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	

VIII. Anhang

Tabelle VIII.21: Pat. 29 (SJ) - Ergebnisse dieser Arbeit

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer	Rep	PFGE	Hly	hlyA	Pap/Prs	papA	papC	papEF	papG Allel I	papG Allel III	Sfa	sfa/focDE	Fim	fimH	K1	kpsMT II	kpsMT III	fyuA	iutA	PAI	niaE	ibeA	bmaE	rfc
25.08.99	1426	29A1U	29KL1	1	I	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1427	29A2U	29KL2	1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
	1428	29A3U	29KL3	1	I	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1429	29A4U	29KL2	1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
	1430	29A5U	29KL3	1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-
15.09.99	1438	29B1U	29KL3	1		+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1439	29B2U	29KL3	1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1440	29B3U	29KL3	1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1441	29B4U	29KL3	1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1442	29B5U	29KL3	1		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1444	29B1	29KL4	2	II	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	1445	29B2	29KL4	2		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	1446	29B3	29KL4	2		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	1447	29B4	29KL4	2		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	1448	29B5	29KL5	2		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
01.12.99	1691	29C1U	29KL6	3	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1692	29C2U	29KL7	4	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1693	29C3U	29KL6	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1694	29C4U	29KL7	4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1695	29C5U	29KL6	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1697	29C1	29KL6	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1698	29C2	29KL6	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1699	29C3	29KL6	3		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1700	29C4	29KL8	5	V	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1701	29C5	29KL6	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
19.04.00		29D																									
28.06.00	2149	29E1U	29KL9	6	VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
	2150	29E2U	29KL9	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2151	29E3U	29KL9	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2152	29E4U	29KL9	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2153	29E5U	29KL9	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2154	29E6U	29KL9	6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

In der Tabelle VIII.22 sind alle Stämme zusammengefaßt, die entweder über einen bestimmten Zeitraum hinweg persistierten oder in Koexistenz gefunden wurden, d.h. innerhalb der Stuhl- und Urinisolat desselben Untersuchungsdatums nachzuweisen waren. Die schwarzen Striche trennen die einzelnen Patientinnen und die roten Striche trennen Stämme mit gleicher Identität (nach PFGE-Muster). In die Übersicht sind die Ergebnisse von Brauchle (2002) und Maibaum (2003) eingearbeitet. Unstimmigkeiten innerhalb der Virulenzfaktoren eines Stammes sind farblich markiert.

Tabelle VIII.22: Isolate-Übersicht von Persistenzen und Koexistenzen aus allen drei Arbeiten

Datum der PE	Nummer in der Stammsammlung	Code des Isolates	Klonnummer oder Initialen des Vorgängers	Rep	PFGE	Hly	hlyA	cnf-1	Pap/Prs	pap	Sfa	sfa/foc(DE) ^a	Fim	fimH bzw. A	K1	fyuA	iutA bzw. aer
05.11.97	509	1F2U	L.B.	12	XIII		+	+		+		-		+	-	+	-
21.01.98	587	1G1U	M.M.	12	XIII		+	+		+		+		+			
21.01.98	588	1G2U	M.M.	12	XIII		+	+		+		+		+			
21.01.98	591	1G5U	M.M.	12	XIII		+	+		+		+		+			
21.01.98	592	1G6U	M.M.	12	XIII		+	+		+		+		+			
01.04.98	705	1H1	M.M.	12	XIII		+	+		+		+		+			
01.04.98	709	1H5	M.M.	12	XIII		+	+		+		+		+			
01.04.98	712	1H1U	M.M.	15	XIII		+	+		+		+		+			
01.04.98	715	1H4U	M.M.	15	XIII		+	+		+		+		+			
17.07.98	823	1I3U	M.M.	15	XIII		+	+		+		+		+			
17.07.98	827	1I7U	M.M.	15	XIII		+	+		+		+		+			
17.07.98	828	1I8U	M.M.	15	XIII		+	+		+		+		+			
17.07.98	829	1I1	M.M.	16	XIII		+	+		+		+		+			
17.07.98	831	1I3	M.M.	15	XIII		+	+		+		+		+			
08.10.98	987	1K1	M.M.	17	XVI		-	-		+		-		+			
08.10.98	995	1K2U	M.M.	19	XVI		-	-		+		-		+			
08.12.99	1739	1P1U	1KL15	28	XVI	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
08.10.98	991	1K5	M.M.	18	XVIII		-	-		-		-		+			
08.10.98	992	1K6	M.M.	18	XVIII		-	-		-		-		+			
08.12.99	1740	1P2U	1KL17	29	XVIII	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
08.12.99	1748	1P4	1KL17	29	XVIII	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
13.10.99	1519	1O1U	1KL11	27	XXXVII	+	+		+	+	-	+	+	+	-	+	+
13.10.99	1525	1O1	1KL11	27	XXXVII	+	+		+	+	-	+	+	+	-	+	+
22.03.00	2001	1Q2U	1KL19	31	XXX	-	-		+	-	+	+	+	+	+	+	-
14.06.00	2058	1R2U	1KL22	33	XXX	-	-		+	-	+	+	+	+	+	+	-
23.07.97	183	2E1	L.B.	4	IV		-	-		-		+-		+	+	+	+
23.07.97	177	2E1U	L.B.	4	IV		-	-		-		+-		+	+	+	+
23.07.97	178	2E2U	L.B.	4	IV		-	-		-		+-		+	+	+	+
07.01.98	479	2G1	L.B.	4	IV		-	-		-		+-		+	+	+	+
07.01.98	484	2G6	L.B.	4	IV		-	-		-		+-		+	+	+	+
16.12.98	1153	2L4	2KL10	19	IV	-	-		+	-	+	+	+	+	+	+	+
13.01.99	1199	2M1	2KL11	19	IV	-	-		+	-	+	+	+	+	+	+	+
21.07.99	1360	2O1U	2KL11	19	XV	-	-		-	-	+	+	+	+	+	+	+
17.07.98	851	2I1	M.M.	12	XI		-	-		-		+		+			
17.07.98	853	2I3	M.M.	12	XI		-	-		-		+		+			
17.07.98	855	2I5	M.M.	13	XI		-	-		-		+		+			
17.07.98	856	2I6	M.M.	13	XI		-	-		-		+		+			
21.10.98	1005	2K5	M.M.	16	XI		-	-		-		+		+			
21.10.98	1006	2K6	M.M.	16	XI		-	-		-		+		+			
21.10.98	1001	2K1	M.M.	14	XII		-	-		-		-		+			
16.12.98	1151	2L2	2KL1	14	XII	-	-		-	-	-	-	+	+	-	-	+
23.07.97	189	3C1	L.B.	5	V		-	-		-		--		+	-	+	+
23.07.97	194	3C6	L.B.	5	V		-	-		-		--		+	-	+	+
17.12.97	448	3H3	L.B.	5	V		-	-		-		--		+	-	+	+
04.02.98	637	3K2	M.M.	5	V		-	-		-		-		+			
12.02.98	643	3L1	M.M.	5	V		-	-		-		-		+			
12.02.98	648	3L6	M.M.	5	V		-	-		-		-		+			
11.03.98	748	3N2	M.M.	5	V		-	-		-		-		+			
11.03.98	751	3N5	M.M.	5	V		-	-		-		-		+			
22.04.98	777	3O2	M.M.	5	V		-	-		-		-		+			

VIII. Anhang

22.04.98	779	3O4	M.M.	5 V		-	-		-	-			+			
22.04.98	966	3O1U	M.M.	5 V		-	-		-	-			+			
22.04.98	971	3O6U	M.M.	5 V		-	-		-	-			+			
26.11.97	437	3G4	L.B.	12 XI		-	-		-	--			+	-	+	-
26.11.97	440	3G1U	L.B.	12 XI		-	-		-	-			+	-	+	-
28.01.98	610	3I2	M.M.	14 XIII		-	-		-	-			+			
28.01.98	613	3I5	M.M.	14 XIII		-	-		-	-			+			
28.01.98	614	3I6	M.M.	14 XIII		-	-		-	-			+			
25.02.98	658	3M3	M.M.	14 XIII		-	-		-	-			+			
25.02.98	660	3M5	M.M.	14 XIII		-	-		-	-			+			
18.11.98	1112	3P2	3KL1	18 XIX	+	+		-	-	-	+	+	-	-	-	+
20.01.99	1220	3Q1	3KL8	22 XIX	+	+		-	-	-	+	+	+	-	-	-
18.11.98	1118	3P1U	3KL7	21 XX	-	-		-	-	-	-	-	+	-	+	-
18.11.98	1119	3P2U	3KL7	21 XX	-	-		-	-	-	-	+	+	-	+	-
18.11.98	1123	3P6U	3KL7	21 XX	-	-		-	-	-	-	+	+	-	+	-
20.01.99	1232	3Q6U	3KL13	26 XX	-	-		-	-	-	-	+	+	+	+	-
22.09.99	1474	3T1U	3KL19	29 XXV	-	-		+	+	-	-	-	+	+	+	+
22.09.99	1478	3T5U	3KL20	29 XXV	+	+		-	+	-	+	+	+	+	+	+
22.09.99	1480	3T1	3KL21	29 XXV	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
08.12.99	1751	3U1U	3KL19	29 XXV	-	-		+	+	-	-	-	+	+	+	+
08.12.99	1754	3U4U	3KL27	32 XXVII	-	-		-	-	-	+	+	-	+	+	+
08.12.99	1758	3U2	3KL28	32 XXVII	+	-		-	-	-	+	+	+	+	+	+
10.12.97	521	5B1U	L.B.	7 VI		+	+		+		+-		+	-	+	-
25.03.98	684	5C1U	M.M.	7 VI		+	+		+		+		+			
25.03.98	685	5C2U	M.M.	7 VI		+	+		+		+		+			
25.03.98	686	5C3U	M.M.	7 VI		+	+		+		+		+			
25.03.98	689	5C6U	M.M.	7 VI		+	+		+		+		+			
19.05.99	2125	5D1U	5KL1	8 VI	+	+		+	+	-	+	+	+	-	+	-
25.03.98	677	5C1	M.M.	6 VII		-	-		-	-	-		+			
25.03.98	682	5C6	M.M.	6 VII		-	-		-	-	-		+			
19.05.99	2131	5D1	5KL2	9 VII	-	-		-	-	-	-	-	+	-	-	+
13.10.99	1537	5E1U	5KL5	12 X	-	-		-	-	-	-	+	+	+	+	+
05.01.00	1835	5F1U	5KL6	12 X	-	-		-	-	-	-	+	+	+	+	+
05.01.00	1841	5F1	5KL5	12 X	-	-		-	-	-	-	+	+	+	+	+
15.10.97	368	8C5	L.B.	6 V		-	-		-	-	--		+	-	-	-
10.12.97	491	8D1	L.B.	8 V		-	-		-	-	--		+		+	+
01.10.98	954	8G2	M.M.	18 XIV		+	+		+		+		-			
31.03.99	2083	8I1	8KL3	20 XIV	+	+		-	+	-	+	-	+	-	+	+
19.01.00	1883	8N1U	8KL20	33 XXVI	+	+		+	-	+	+	+	-	+	-	-
19.01.00	1885	8N3U	8KL21	33 XXVI	+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	-
19.01.00	1889	8N1	8KL26	34 XXVI	+	+		-	-	-	+	+	+	+	-	-
29.03.00	2006	8O1U	8KL25	33 XXVI	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-
29.03.00	2007	8O2U	8KL29	36 XXVI	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-
21.06.00	2143	8P1U	8KL29	36 XXVI	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-
07.04.99	2101	11D1U	11KL1	6 VI	+	+		-	+	-	+	+	+	-	+	-
07.04.99	2107	11D1	11KL1	6 VI	+	+		-	+	-	+	+	+	-	+	-
07.04.99	2111	11D5	11KL2	6 VI	+	+		-	+	-	+	+	+	-	+	-
25.08.99	1408	11E1	11KL1	6 VI	+	+		-	+	-	+	+	+	-	+	-
15.12.99	1787	11F1U	11KL4	7 VII	-	-		-	-	-	-	-	+	+	+	+
15.12.99	1794	11F2	11KL4	7 VII	-	-		-	-	-	-	-	+	+	+	+
15.12.99	1797	11F5	11KL5	7 VII	-	-		-	-	-	-	-	+	+	+	+
15.12.99	1791	11F5U	11KL3	6 VIII	-	-		+	+	-	-	-	+	+	+	+
15.12.99	1793	11F1	11KL3	6 VIII	-	-		+	+	-	-	-	+	+	+	+
02.10.98	961	22A2	M.M.	2 II		+	+		+		+		+			
07.10.98	981	22B2U	M.M.	2 II		+	+		+		+		+			
07.10.98	973	22B1	M.M.	3 III		-	-		+		-		+			
07.10.98	980	22B1U	M.M.	3 III		-	-		+		-		+			
07.10.98	983	22B4U	M.M.	3 III		-	-		+		-		+			

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt, mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben. Ich habe noch nie versucht, einen akademischen Grad zu erwerben, es wurde mir auch kein solcher entzogen. Gegen mich ist kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

Opferbaum, Juli 2007

Alexander Hoffmann-Wolz

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt selbstverständlich Herrn Prof. Dr. Dr. Hacker für die Ermöglichung dieser hochinteressanten Arbeit. Ebenfalls besonderen Dank schulde ich meiner Betreuerin Frau Dr. Gabriele Blum-Öhler für ihre Umsorgung inklusive der notwendigen Anleitungen.

Vielen Dank auch an die Nephrologische Abteilung der Inneren Medizin der Universitätsklinik Jena unter Herrn Prof. Dr. Fünfstück für die Bereitstellung der Proben und der dazu gehörenden Patientendaten.

Desweiteren möchte ich mich sehr gerne bei Herrn Prof. Dr. Reidl vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg für die Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit bedanken.

Ein sehr, sehr herzliches Dankeschön an alle Laborassistentinnen und -assistenten, Diplomanden und Doktoranden, ohne deren höchst bereitwillige und freundliche Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich habe immer und überall umfassend Auskunft und Hilfe bekommen, worüber ich mich sehr gefreut habe. Im alltäglichen Laborklima konnte man sich sehr wohl fühlen.

Weiterhin gebührt mein allerherzlichster Dank allen Menschen die mich bis zum Abschluß dieser Arbeit nach Kräften unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinen Eltern, ohne die das Studium und diese Dissertation ebenfalls nicht möglich gewesen wären. Vor allem aber danke ich meiner Ehefrau Natalie und unserem lebensfreudespendenden Nachwuchs und all meinen guten Freunden für ihr Verständnis und den nötigen Beistand und dafür, daß sie mich auch trotz schwieriger Zeiten bisher immer ertragen haben.

Vergelt's Gott.

Ihr bzw. Euer

