

Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. rer. nat. J. Hacker

Molekulargenetische Untersuchungen
zur Persistenz und Genomvariabilität von *Escherichia coli* Isolaten
von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Maria Maibaum
aus Freiburg

Würzburg, September 2002

Referent: Prof. Dr. rer. nat. J. Hacker
Korreferent: Prof. Dr. med. S. Suerbaum
Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2003

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Harnwegsinfektionen	1
1.1.1	Klinik	2
1.1.2	Erregerspektrum	3
1.2	<i>Escherichia coli</i>	4
1.2.1	Pathogenitätsfaktoren von uropathogenen <i>E. coli</i> (UPEC)	5
1.2.2	Pathogenitätsinseln	9
1.3	Wirtsfaktoren bei Harnwegsinfektionen	10
1.4	Ziele der Arbeit	11
2	Material	12
2.1	Geräte	12
2.2	Chemikalien	12
2.3	Medien und Nährböden	13
2.4	Puffer und Lösungen	13
2.5	Bakterienstämme	14
2.6	Oligonukleotide	14
2.7	Größenstandards	15
3	Methoden	16
3.1	Isolierung der Bakterienstämme aus Stuhl- und Urinproben	16
3.2	Phänotypische Untersuchungen	16
3.2.1	Hämolyse	16
3.2.2	P-Fimbrien	16
3.2.3	S-Fimbrien	17
3.2.4	Typ 1-Fimbrien	17
3.3	Isolierung von Gesamt-DNA	17
3.4	Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
3.4.1	Rep-PCR	19

3.5	Agarose-Gelelektrophorese	19
3.6	Pulsfeldgelelektrophorese	20
3.6.1	Isolierung von High Molecular Weight DNA	20
3.6.2	Restriktionsspaltung von High Molecular Weight DNA	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Einzelauswertung der Patientinnen	25
4.1.1	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 1 und Darstellung des klinischen Verlaufs	26
4.1.1.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	30
4.1.2	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 2 und Darstellung des klinischen Verlaufs	31
4.1.2.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	34
4.1.3	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 3 und Darstellung des klinischen Verlaufs	35
4.1.3.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	38
4.1.4	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 5 und Darstellung des klinischen Verlaufs	39
4.1.4.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	40
4.1.5	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 8 und Darstellung des klinischen Verlaufs	41
4.1.5.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	43
4.1.6	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 11 und Darstellung des klinischen Verlaufs	44
4.1.6.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	46
4.1.7	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 16 und Darstellung des klinischen Verlaufs	47
4.1.7.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	48
4.1.8	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 19 und Darstellung des klinischen Verlaufs	49
4.1.8.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	51

4.1.9	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 20 und Darstellung des klinischen Verlaufs	52
4.1.9.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	54
4.1.10	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 21 und Darstellung des klinischen Verlaufs	55
4.1.10.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	56
4.1.11	Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 22 und Darstellung des klinischen Verlaufs	57
4.1.11.1	Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin	59
4.2	Auftreten von Persistenzen einzelner <i>E. coli</i>-Isolate	60
4.3	Häufigkeit der untersuchten Gene und der phänotypischen Expression	63
4.3.1	Genotypische Eigenschaften	63
4.3.2	Phänotypische Eigenschaften	64
4.3.3	Phänotypische Expressionsrate	65
4.3.4	Phänotypische Besonderheiten	66
4.3.5	Genkombinationen	66
4.4	Verteilung der Gene und Expressionsraten auf verschiedene klinische Aktivitätsstufen	68
4.4.1	Häufigkeit der untersuchten Gene und Expressionsraten bei den Stuhlklonen in verschiedenen klinischen Aktivitätsstufen	69
4.4.2	Häufigkeit der untersuchten Gene und Expressionsraten bei den Urinklonen in verschiedenen klinischen Aktivitätsstufen	71
4.4.3	Genkombinationen bei Stuhl- und Urinklonen	72
4.5	Einfluß medikamentöser Therapien	75
4.5.1	Antibiotische Therapie	75
4.5.2	Acimethin-Langzeitmetaphylaxe	77
5	Diskussion	79
5.1	Häufigkeit der untersuchten Gencluster	79
5.2	Klinische Aktivität	81
5.3	Phänotypische Expression	82
5.4	Identitäts-Screening	83
5.5	Persistenz und rezidivierende Infektionen	84

5.6	Deletionen	85
5.7	Acimethin-Langzeitmetaphylaxe	86
6	Zusammenfassung	88
7	Literaturverzeichnis	89
8	Anhang	95
8.1	Abkürzungen	95
8.2	Übersichtstabellen	96

1 Einleitung

1.1 Harnwegsinfektionen

Harnwegsinfektionen (HWI) sind nach den Infektionen des Respirationstrakts die häufigsten bakteriellen Erkrankungen des Menschen. Sie sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Keimen im normalerweise sterilen Urin.

Der Infektionsweg ist dabei meist ascendierend, d. h. die Erreger, die gewöhnlich in der Darmflora zu finden sind, gelangen über das periurethrale Gewebe und die Harnröhre in die Blase. Unter Umständen können sie noch weiter über den Harnleiter in die Niere wandern und dort eine Pyelonephritis auslösen. In seltenen Fällen kann die Infektion jedoch auch durch hämatogene Streuung der Bakterien entstehen.

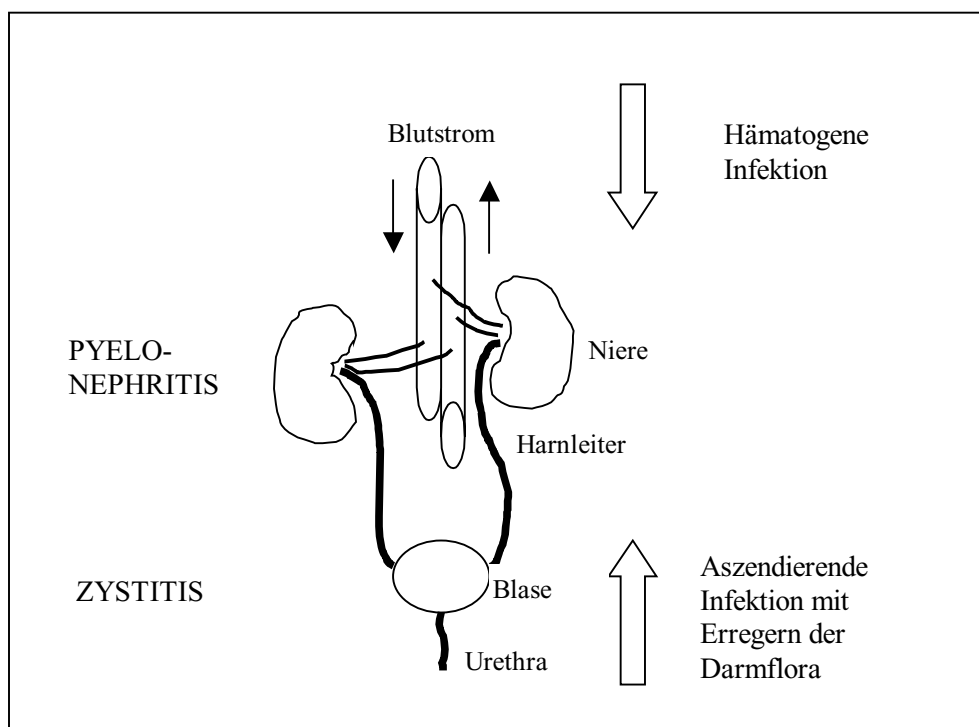


Abb. 1 Darstellung des Harntraktes und der Infektionswege bei Harnwegsinfektionen

Frauen sind aufgrund ihrer im Vergleich zu Männern wesentlich kürzeren Harnröhre weitaus häufiger betroffen. Es wird geschätzt, daß jede zweite Frau zumindest einmal in ihrem Leben an einer Zystitis erkrankt. Ein Viertel dieser Frauen erleiden ein Rezidiv, wobei die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs mit der Anzahl der vorausgegangenen

Infektionen zunimmt (Sökeland, 1993). Zudem machen Harnwegsinfektionen mit über 40 % den größten Anteil der nosokomialen Infektionen aus (Georgopoulos *et al.*, 1997).

1.1.1 Klinik

Harnwegsinfektionen umfassen eine ganze Gruppe von Krankheitsbildern mit unterschiedlicher Symptomatik und Prognose.

Dazu gehören die Urethritis und die Zystitis (sogenannte Infektion der unteren Harnwege) sowie die akute und chronische Pyelonephritis (sogenannte Infektion der oberen Harnwege). Typische Symptome einer Blasenentzündung sind Dysurie (erschwertes Wasserlassen), Pollakisurie (häufiger Harndrang mit geringen Urinmengen) und teilweise suprapubische Schmerzen. Entzündungen der Niere sind mit Fieber, eventuell Schüttelfrost und klopfschmerzhaftem Nierenlager assoziiert. Es können aber auch gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen und Subileus oder Kopfschmerzen auftreten. Dabei schließen die Symptome einer unteren Harnwegsinfektion eine Beteiligung der oberen Harnwege nicht aus.

Die chronische Pyelonephritis entwickelt sich nur bei Vorhandensein prädisponierender Faktoren, die den Harnfluß behindern oder stören. Oft sind die Symptome in diesem Fall lediglich uncharakteristisch wie zum Beispiel dumpfe Rückenschmerzen, Abgeschlagenheit, Gewichtsabnahme, Brechreiz oder Kopfschmerzen. Mögliche Komplikationen der Pyelonephritis sind die Entstehung eines paranephritischen Abszesses und bei Streuung der Bakterien in die Blutbahn die Entwicklung einer lebensbedrohlichen Urosepsis. Chronische Krankheitsverläufe können zur progredienten Niereninsuffizienz oder zur Ausbildung eines Hypertonus führen.

Von den oben beschriebenen symptomatischen Harnwegsinfektionen wird die sogenannte asymptomatische Bakteriurie unterschieden. Sie ist durch eine zufällig nachgewiesene, signifikante Bakteriurie bei beschwerdefreien Personen gekennzeichnet, d. h. bei einem Nachweis von Keimzahlen ab 10^5 /ml Urin (Kunin, 1994). In der Regel wird diese nicht therapiert, Behandlungsbedarf besteht jedoch bei schwangeren Frauen, im Kindesalter sowie bei Vorliegen einer Obstruktion der Harnwege (Herold, 1999).

Desweiteren wird zwischen komplizierten und unkomplizierten Harnwegsinfektionen differenziert. Dabei beinhaltet der Begriff „komplizierte Infektion“ Anomalien des Harntrakts, wie zum Beispiel Obstruktionen, Steine, Fisteln oder Fremdkörper, einschließlich Blasenverweilkatheter. Dieser Umstand macht oft neben einer umfassenden Antibiotikatherapie auch eine Sanierung des Harntrakts notwendig.

Dagegen findet man bei unkomplizierten Infektionen weder in der Struktur noch in der Funktionsüberprüfung des Harntrakts Auffälligkeiten. Risikofaktoren für rezidivierende Infektionen hier sind häufiger Geschlechtsverkehr, das Benutzen spermizider Produkte, ein frühes, erstmaliges Erkrankungsalter sowie eine positive, mütterliche Infektionsanamnese (Hooton, 2001). Normalerweise ist in diesen Fällen eine einfache Antibiotikatherapie über drei Tage bei Zystitis oder über sieben bis zehn Tage bei Pyelonephritis ausreichend (Schaeffer, 1997).

1.1.2 Erregerspektrum

Auch bei der Betrachtung des typischen Erregerspektrums ist es sinnvoll, die Unterscheidung zwischen unkomplizierten und komplizierten Harnwegsinfektionen beizubehalten.

Unkomplizierte Infektionen sind meistens ambulant erworben. In ungefähr 80 % der Fälle liegen Monoinfektionen mit *Escherichia coli* vor (Warren, 1996). In der Regel sprechen diese gut auf eine kurzzeitige Antibiotikatherapie an. Bei komplizierten oder auch nosokomialen, d. h. im Krankenhaus erworbenen Harnwegsinfektionen handelt es sich dagegen oft um Mischinfektionen. Nicht selten werden auch multiresistente Keime in der Kultur gefunden.

Georgopoulos und Buxbaum beschrieben folgende Erreger bei nosokomialen Harnwegsinfektionen: Am häufigsten löste auch hier *Escherichia coli* (29 %) die Infektion aus, gefolgt von *Pseudomonas aeruginosa* (11 %) und anderen gramnegativen Bakterien wie *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.* oder *Serratia sp.* (18 %) (Georgopoulos *et al.*, 1997). In 17 % der Fälle wurden als Erreger *Enterococcus faecalis* oder *Staphylococcus epidermidis* identifiziert, *Staphylococcus aureus* war nur zu 2 % der infektiösauslösende Keim. Interessanterweise sind neben Bakterien auch Pilze in der Lage, Harnwegsinfektionen auszulösen. So machte der Hefepilz *Candida albicans* immerhin 5 % des Erregerspektrums aus (Georgopoulos *et al.*, 1997).

1.2 *Escherichia coli*

Die von Theodor Escherich (1857-1911) entdeckten Bakterien dieser Art gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Dabei handelt es sich um gramnegative, meist bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien von 0,5-1,5 µm Dicke und 2-4 µm Länge. Ihr natürliches Habitat ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Die Familie der *Enterobacteriaceae* umfaßt derzeit über 100 verschiedene Spezies (Kayser *et al.*, 2001). Nur ein Viertel davon sind jedoch entweder humanpathogene Keime oder werden häufiger beim Menschen gefunden. Einige rufen charakteristische Krankheiten wie z. B. den Typhus, die bakterielle Ruhr oder die Pest hervor. Andere sind fakultativ pathogen, gehören aber zu den heute am häufigsten als Krankheitserreger isolierten Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*.

Escherichia coli kann intestinale und extraintestinale Infekte des Menschen verursachen. Darmpathogene *E. coli* werden im Hinblick auf Pathogenese und Krankheitsbild in mindestens vier Pathovaren eingeteilt.

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) rufen die epidemisch oder sporadisch auftretende Säuglingsdiarrhö hervor. In den Industrienationen ist diese Krankheit selten geworden, in den Entwicklungsländern trägt sie jedoch beträchtlich zur Säuglingssterblichkeit bei. Die Pathogenität der enterotoxischen *E. coli* (ETEC) beruht auf zwei Enterotoxinen: dem hitzelabilen LT (sehr ähnlich dem Cholera toxin) sowie dem hitzestabilen ST. Es gibt Stämme, die beide oder nur eines der beiden Toxine produzieren. Das klinische Bild einer Infektion ist durch massive Durchfälle charakterisiert. ETEC sind die häufigsten Erreger der sogenannten Reisediarrhö.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) können in die Schleimhaut des Kolons penetrieren und geschwürige Entzündungen verursachen. Die Klinik entspricht der durch Shigellen ausgelösten bakteriellen Dysenterie.

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sind die Ursache einer hämorrhagischen Kolitis und des „hämolytischen Urämiesyndroms“, das mit akutem Nierenversagen, Thrombozytopenie und Anämie einhergeht. EHEC besitzen einerseits spezifische Fimbrien für Adhärenz an Enterozyten und können andererseits shigaähnliche Toxine (Syn. Vero-Zytotoxine) produzieren.

Zu den extraintestinalen Infektionen, die durch Kolibakterien ausgelöst werden können, gehören Harnwegsinfektionen, Gallenblasen- und Gallenwegsentzündungen, Wundinfektionen, Appendizitis und Peritonitis, bei Früh- und Neugeborenen die Meningitis sowie die Sepsis. Sepsis hervorrufende *E. coli* weisen oft die plasmidkodierte Eigenschaft der Serumresistenz auf. Sie werden auch im Pathovar SEPEC zusammengefaßt.

Der häufigste durch *Escherichia coli* ausgelöste, extraintestinale Infekt ist allerdings der Harnwegsinfekt. Die Erreger werden in diesem Fall als uropathogene *E. coli* (UPEC) bezeichnet.

1.2.1 Pathogenitätsfaktoren von uropathogenen *E. coli* (UPEC)

Obwohl uropathogene *E. coli* ursprünglich größtenteils aus der intestinalen Darmflora stammen, unterscheiden sie sich doch von den normalen, apathogenen Stuhlisolaten. Es ist allgemein anerkannt, daß UPEC eine Reihe von Virulenzfaktoren besitzen, die es ihnen ermöglichen, in den Harntrakt zu gelangen und dort eine Infektion auszulösen (Donnenberg and Welch, 1996). Diese sollen im folgenden näher beschrieben werden.

Adhäsine

Die Fähigkeit, an menschliche Uroepithelzellen zu binden, ist eine wichtige Voraussetzung zur Besiedelung des Harntraktes. Diese wird durch sogenannte Fimbrien oder Pili gewährleistet. Morphologisch handelt es sich um aus Proteinen bestehende Zellfortsätze, 3-7 nm im Durchmesser und bis zu 2-3 µm lang (Jacobson, 1986). Die verschiedenen Fimbrienarten, die jeweils an spezifische Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche binden, ähneln sich in ihrer genetischen Organisation und somit auch in ihrem strukturellen Aufbau. Wie Abb. 2 zeigt, setzen sich die in dieser Arbeit betrachteten Fimbriengencuster aus neun bis elf Genen zusammen. Ein Fimbrienadhäsin besteht aus einer Hauptuntereinheit (z.B. PapA) und mehreren „minor subunits“, die für die Regulation der Fimbrienexpression sowie die Biosynthese wichtig sind. Weitere Untereinheiten sind für die spezifischen Adhäsine verantwortlich. Außerdem existiert eine Vielzahl an sogenannten nicht-fimbriellen Adhäsinen.

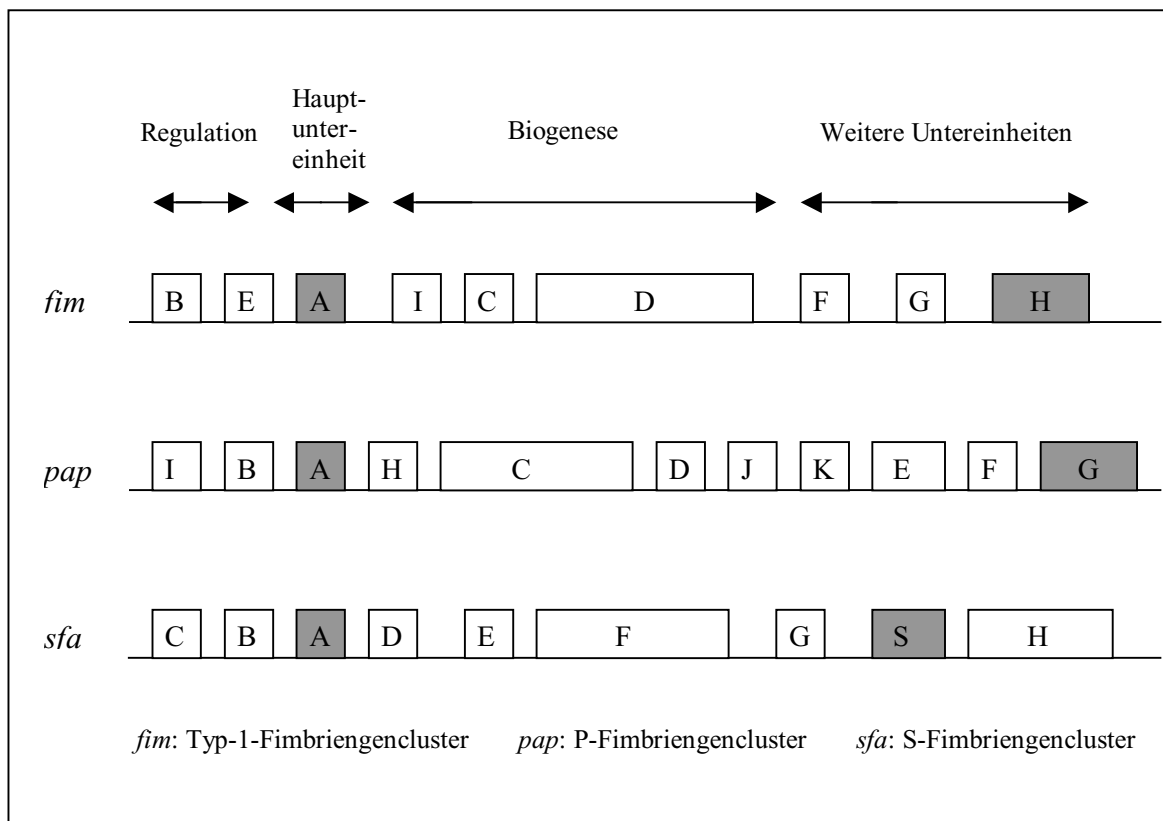


Abb. 2 Genetische Organisation der drei wichtigsten Fimbrienarten uropathogener *E. coli*.

Die Hauptuntereinheiten (A) und die Adhäsine der jeweiligen Fimbrientypen sind grau unterlegt. Die einzelnen Gene der Fimbriengencluster werden vier funktionellen Bereichen zugeordnet (Regulation der Fimbrienexpression, strukturelle Hauptuntereinheit, Biogenese und sog. „minor subunits“, zu denen auch die Adhäsine gehören).

P-Fimbrien wird die entscheidende Rolle bei der Auslösung einer akuten Pyelonephritis zugeschrieben. Källenius und Mitarbeiter konnten sie bei über 90 % der Stämme nachweisen, die dieses Krankheitsbild verursachten, während bei Zystitis oder ABU jeweils unter 20 % der Stämme diese Fimbrienart besaßen (Källenius *et al.*, 1981).

Das P-Fimbrien-Gencluster besteht aus elf Genen (Winberg *et al.*, 1997), wobei die PapG-Untereinheit für die Bindung an die α Gal- β -(1-4)-Gal-haltigen Glykolipidrezeptoren der Uroepithelzellen und Endothelzellen der Nieren verantwortlich ist (Leffler and Svanborg-Eden, 1980). Da sich diese Gal-Gal Einheiten auch auf den P-Blutgruppen-Antigenen befinden, kann die Produktion von P-Fimbrien durch Hämagglutinationstests nachgewiesen werden.

P-Fimbrien lassen sich in drei verschiedene Gruppen mit geringfügig unterschiedlichen Bindungseigenschaften unterteilen (Prf-, Prs- und Pap-Fimbrien). Da in dieser Arbeit

bei der Untersuchung der Isolate auf P-Fimbrien mit Hilfe der PCR nicht zwischen den einzelnen Gruppen differenziert wurde, wird im folgenden von *pap/prs* positiven Isolaten gesprochen.

Wesentlich seltener als P- werden sogenannte S-Fimbrien bei UPEC gefunden. Sie gehören mit den F1C-Adhäsinen zu einer Familie und sind genetisch, immunologisch und funktionell sehr ähnlich (Ott *et al.*, 1986). Ihre sialinsäurehaltigen Rezeptoren finden sich nicht nur im Harntrakt, sondern auch im Gehirn, so daß S-Fimbrien auch häufig bei *E. coli* Isolaten der Neugeborenenmeningitis nachgewiesen werden (Hacker *et al.*, 1993). Da S-Fimbrien aber auch an das Tamm-Horsfall-Protein (THP) binden, das in der Niere gebildet wird und einen wesentlichen Anteil an der physiologischen Proteinurie hat, werden S-Fimbrien tragende UPEC auf diese Weise aus dem Harntrakt eliminiert, was ihre fehlende klinische Relevanz bezüglich Harnwegsinfektion erklären könnte (Leeker *et al.*, 1997).

S-Fimbrien können ebenfalls mit Hilfe von Hämagglutinationstests phänotypisch nachgewiesen werden, bei F1C-Fimbrien funktioniert dieser Test allerdings nicht. Bei den genotypischen Untersuchungen wird im Folgenden, vergleichbar der P-Fimbrien, von *sfa/foc* positiven Stämmen gesprochen.

Typ-1-Fimbrien werden nicht nur auf UPEC, sondern auch bei einer Vielzahl von anderen Enterobakterien häufig gefunden. Auch in diesem Fall werden die Fimbrien von einem Gencluster kodiert. Die FimH-Untereinheit ist für die Bindung an mannosehaltige Rezeptoren verantwortlich, so daß auch die Expression dieses Fimbrientyps im mannosesensitiven Hefeagglutinationstest phänotypisch bewiesen werden kann. Bei den genotypischen Untersuchungen wurde in dieser Arbeit in der PCR das *fimA*-Gen vervielfältigt.

Typ-1-Fimbrien vermitteln allerdings nicht nur die Bindung an Rezeptoren des Harntrakts, sondern auch an solche im Gastrointestinaltrakt einschließlich des Oropharynx, der physiologischen Eintrittspforte in den menschlichen Körper (Sokurenko *et al.*, 1998). Andererseits binden sie ebenfalls an den CD 11/18 Komplex auf Leukozyten und Makrophagen, was die Elimination Typ-1-Fimbrien-tragender Keime aus dem Blut erleichtert (Mühldorfer *et al.*, 1994).

Im Harntrakt stellt dieser Fimbrientyp eine Voraussetzung für Persistenz und Wachstum in dieser Nische dar (Orndorff *et al.*, 1990). Sokurenko und Mitarbeiter konnten darüber hinaus zeigen, daß zufällige Punktmutationen im *fimH*-Gen die Bindungskapazität und somit die Virulenz der Erreger steigern können (Sokurenko *et al.*, 1998). Neueste Daten belegen, dass Typ-1-Fimbrien tragende *E. coli* nicht nur in die Uroepithelzellen der Blase eindringen, sondern sich auch intrazellulär in sog. „Bakterienfabriken“ vermehren können (Mulvey *et al.*, 2001).

Toxine

Neben Fimbrienadhäsinen stellen Toxine eine weitere wichtige Gruppe der Pathogenitätsfaktoren von UPEC dar.

Das von *E. coli* produzierte α -Hämolysin ist der Prototyp einer Familie von strukturell und funktionell ähnlichen Zytolysinen und Zytotoxinen, die auch als RTX Toxine (repeats in toxin) bezeichnet und von einer Vielzahl von gram-negativen Bakterien gebildet werden (Ludwig *et al.*, 1996). α -Hämolysin bildet Poren in eukaryoten Zellmembranen und bewirkt somit die Lyse der Zellen. Anders als der Name vermuten läßt, kann dieses Toxin jedoch auch Granulozyten und Epithelzellen lysieren (Mühdorfer *et al.*, 1994), und trägt somit wesentlich zur Virulenz der Erreger bei.

Das Hämolysingencluster besteht aus den vier Genen *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* und *hlyD*, wobei *hlyA* das noch inaktive Pro-Hämolysin kodiert, das durch HlyC aktiviert wird. Die durch *hlyB* und *hlyD* kodierten Proteine sind Bestandteil der Zellmembran und spielen eine wichtige Rolle bei der Sekretion des Hämolysins in die Umgebung (Ludwig *et al.*, 1996).

Ein weiteres Toxin, das nicht nur von UPEC, sondern auch von anderen *E. coli*-Pathovaren gebildet werden kann, ist der zytotoxisch-nekrotisierende Faktor 1 (CNF 1). Man fand heraus, daß CNF 1 die Reorganisation der wirtszellulären Mikrofilamente in dicke Streßfasern induziert, was zur Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen führt (Caprioli *et al.*, 1983). Seine Rolle bei der Auslösung von Harnwegsinfektionen ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt.

Weitere Pathogenitätsfaktoren

Außer den schon erwähnten Fimbrien-Adhäsinen und Toxinen existieren eine Reihe von weiteren Pathogenitätsfaktoren, die die Virulenz uropathogener *E. coli* steigern können.

Dazu gehört die Fähigkeit zur Kapselbildung, die interessanterweise nur extraintestinale, nicht aber intestinale *E. coli*-Stämme besitzen. Vor allem die Typen K1 und K5 sind unter UPEC weit verbreitet. Da sie gewissen Wirtsmolekülen stark ähneln und deshalb nur geringfügig immunogen sind, erleichtern sie den Bakterien das Überleben im Gewebe (Mühldorfer *et al.*, 1994).

Lipopolysaccharide bilden eine Komponente der äußeren Bakterienzellwand und werden auch als O-Antigene bezeichnet. Bestimmte LPS-Strukturen, wie die Typen O1, O2, O4, O6, O18 und O75, sind dabei für uropathogene *E. coli* spezifisch (Hacker, 1997). Sie sind für verschiedene biologische Effekte, wie zum Beispiel die Entzündungsreaktion oder die Serumresistenz mitverantwortlich (Mühldorfer *et al.*, 1994).

Schließlich sind UPEC in der Lage, die Eisenaufnahmesysteme Aerobactin und Enterochelin zu bilden und somit ihre pathogene Potenz zu steigern, da Eisen u. a. für den Sauerstoff- und Elektronentransport sowie die DNA-Synthese unerlässlich ist. Weiterhin wird die Wachstumskinetik der Bakterien verbessert (Johnson, 1991).

1.2.2 Pathogenitätsinseln

Die Virulenzgene uropathogener *E. coli* können Teile von Plasmiden oder Bakteriophagen sein, in den meisten Fällen sind sie jedoch auf dem Bakterienchromosom lokalisiert (Hacker *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, daß die chromosomalen Regionen, die Virulenz-assoziierte Gene tragen, distinkte Einheiten darstellen, die als „Pathogenitätsinseln“ (PAIs) bezeichnet werden (Hacker *et al.*, 1990). Dabei handelt es sich um große, instabile DNA-Regionen, die bis zu 200 kb groß sein können (Hacker *et al.*, 1997). Auch Falbo und Mitarbeitern fiel bei der Untersuchung von *E. coli* auf, daß die Produktion von CNF 1 eng mit der von Hämolyysin assoziiert ist

(Falbo *et al.*, 1992). PAIs werden allerdings außer bei *E. coli* auch bei einer Reihe von anderen gram-negativen Bakterien wie z. B. *Yersinia* oder *Salmonella* gefunden (Hacker *et al.*, 1997).

Die ersten PAIs wurden im Genom der UPEC-Stämme 536 und J96 entdeckt und näher erforscht (Blum *et al.*, 1994, Swenson *et al.*, 1996). Für den UPEC-Stamm 536 (O6:K15:H31) konnten zwei PAIs nachgewiesen werden, die ein *hly*-Gencluster (*hlyI*, PAI I₅₃₆) bzw. ein *hly*- und *prs*-Gencluster (*hlyII*, PAI II₅₃₆) tragen. Zusätzlich werden die PAIs I und II₅₃₆ dieses Stammes von tRNA-Genen flankiert, die transkriptionell aktiv und von essentieller Bedeutung für die Virulenzeigenschaften des Keimes sind (Blum *et al.*, 1994). Mittlerweile sind allein beim Stamm 536 vier PAIs identifiziert worden (Hacker *et al.*, 1999).

Für den UPEC-Stamm J96 (O4:K6) konnten beispielsweise zwei Pathogenitätsinseln nachgewiesen werden: PAI I_{J96} trägt dabei die Gene *hlyI* und *pap*, PAI II_{J96} die Gene *hlyII*, *prs* und *cnf-1* (Blum *et al.*, 1995).

Für den Stamm 536 konnte nachgewiesen werden, daß diese Pathogenitätsinseln vom Chromosom deletieren können, wobei aus virulenten Krankheitserregern harmlose Stämme entstehen (Hacker *et al.*, 1997). Andererseits kann der Erwerb neuer Gene durch horizontalen Gentransfer, entweder direkt durch Transformation nackter DNA oder durch Transduktion über Phagen, zu neuen, pathogeneren Keimen führen (Hacker *et al.*, 1997).

1.3 Wirtsfaktoren bei Harnwegsinfektionen

Entstehung und Verlauf einer Harnwegsinfektion werden einerseits durch die Pathogenität der Infektionserreger bestimmt, andererseits spielen aber auch eine Reihe von Wirtsfaktoren eine wichtige Rolle im Krankheitsprozeß.

Wie bereits anfangs beschrieben, liegen sogenannten komplizierten Infektionen veränderte, wirtsspezifische Grundbedingungen wie z.B. ein vesikoureteraler Reflux, Obstruktionen, eine Nierenfunktionseinschränkung oder gynäkologische Erkrankungen zugrunde. Darüber hinaus sind aber auch bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen manche Individuen häufiger betroffen als andere, abhängig von lokalen und systemischen, immunologischen und nicht-immunologischen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus. Für die Blutgruppe B, insbesondere für B-Sekretoren, wird

beispielsweise ein protektiver Effekt durch galaktosehaltige Oberflächenmoleküle gegenüber dem bakteriellen Adhäsinsvermögen postuliert (Fünfstück *et al.*, 1997). Da das P₁-Blutgruppenantigen mit dem P-Fimbrien-Rezeptor identisch ist, sind Personen mit diesem Antigen für die Besiedelung mit P-Fimbrien positiven Mikroorganismen disponiert. Des weiteren weisen sie häufiger symptomatische Infektionsereignisse sowie destruktive Nierenveränderungen auf (Fünfstück *et al.*, 1997).

Andere Beispiele für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko sind ein geschwächter Immunstatus, wie z.B. bei Diabetes mellitus, oder ein veränderter Hormonhaushalt, wie z.B. in der Schwangerschaft. Auch die Zusammensetzung des Urins bezüglich pH-Wert und Ionengehalt beeinflusst selbstverständlich das Wachstumsvermögen der Infektionserreger.

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Studie wurden sowohl aus Stuhl- als auch aus Urinproben gewonnene *E. coli*-Isolate von Patientinnen, die unter chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden, auf die Pathogenitätsfaktoren α -Hämolysin, P-, S- und Typ-1-Fimbrien sowie den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 untersucht, um ein Virulenzprofil der Infektionserreger zu erhalten und Aussagen über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Gencluster sowie der phänotypischen Expressionsrate treffen zu können. Außerdem wurde mit Hilfe der Rep-PCR und der Pulsfeldgelelektrophorese ein Identitäts-Screening der Isolate durchgeführt. Dies erlaubte eine Zuordnung der einzelnen Stämme zu Klonen und die Beobachtung von Persistenzen über einen längeren Zeitraum hinweg. Schließlich sollten auf diese Weise mögliche Deletionen *in vivo* erfaßt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Analysenwaage	Chyo
Autoklaven	Teknomara
Brutschrank	Memmert TV 40 b
Cleanbench	Nunc
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Grobwaage	Chyo
Kamera	Nikon 301
Kühlzentrifuge	Beckmann J2-21, JA10- und JA20-Festwinkelrotoren
Magnetrührer	Janke und Kunkel, KMO 2
Netzgeräte	Consort E 451
PCR-Thermocycler	Bio-med Thermocycler 60
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Unicam 8625
Pipetten	Gilson P20, P200, P1000
Schüttelinkubator	Bühler W55 swip
Tischinkubator	Eppendorf-Thermostat 5320 Liebisch Thermoblock
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415
UV-Crosslinker	Biorad
UV-Transilluminator	UVP inc.
Wasserbad	GFL

2.2 Chemikalien

Die Chemikalien zum Ansetzen von Puffern, Medien und Lösungen wurden von den Firmen Roth, Sigma, Merck und Gibco BRL bezogen.

2.3 Medien und Nährböden

LB-Flüssigmedium: 10 g Pepton aus Casein
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1 l H₂O_{dest.}

LB-Agarplatten: Vor dem Autoklavieren werden 15 g Agar pro Liter Medium zugegeben.

Die einzelnen Komponenten werden abgewogen, in H₂O_{dest.} gelöst und 20 min autoklaviert.

Blutagarplatten: Nach Abkühlen des Agars auf 45°C werden 50 ml gewaschenes Humanblut zugegeben.

Mc Conkey-Agar: 40 g Mc Conkey-Base ad 1 l H₂O_{dest.}
Nach dem Autoklavieren wird 1% Lactose zugegeben.

2.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen verwendet.

Laufpuffer für die Gelelektrophorese:

10x TBE-Puffer: 108 g Tris
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1 l H₂O_{dest.}

50x TAE-Puffer: 242 g Tris
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1 l H₂O_{dest.}

Alle weiteren verwendeten Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

2.5 Bakterienstämme

Tab.1 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stämme	Eigenschaften	Referenz
536	O6:K15:H31, <i>hly1</i> u. 2 ⁺ , <i>sfa</i> ⁺ , <i>fim</i> ⁺ , <i>prf</i> ⁺ , <i>sms</i> , PAI 1 ⁺ , PAI 2 ⁺ , vor der Behandlung mit RP1, UPEC-Isolat.	Berger <i>et al.</i> 1982
536-21	aus 536, PAI 1 ⁺ , PAI 2 ⁻ , UPEC-Isolat ⁻	Hacker <i>et al.</i> 1983
J96	O4:K6:H-, <i>hly1</i> ⁺ , <i>hly2</i> ⁺ , <i>pap</i> ⁺ , <i>prs</i> ⁺ , <i>pil</i> ⁺ , F1C ⁻ , <i>cnf1</i> ⁺ , PAI 1 ⁺ , PAI 2 ⁺ , UPEC-Isolat	Hull <i>et al.</i> 1982

2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden alle von der Firma MWG-Biotech bezogen.

Tab.2 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

PRIMER	SEQUENZ 5'>3'	REFERENZ	VERWENDUNG
Rep1R-I	III ICG ICG ICA TCI GGC	Woods <i>et al.</i> (1993)	Rep-PCR
pri 1	ATG TCT GTG CAG CGG GTT CT	Promotion A. Ölschläger	<i>sfaG</i> + <i>focF</i>
pri 2	ATT ACC GGC CTT TAC CGG AA	Promotion A. Ölschläger	<i>sfaG</i> + <i>focF</i>
pri 3	GTG CAG ATT AAC ATC AGG GG	Promotion A. Ölschläger	<i>prsF</i> + <i>papF</i>
pri 4	ATG CTC ATA CTG GCC GTG GT	Promotion A. Ölschläger	<i>prsF</i> + <i>papF</i>
RTX6II-R	TCT GAA TTC TGA TTA GAG ATA TCA CCT GAC TC	Kuhnert <i>et al.</i> ,(1997)	<i>hlyA</i>
RTX6II-L	TAT GAA TTC ACT CAT ATC AAT GG	Kuhnert <i>et al.</i> ,(1997)	<i>hlyA</i>

ECCNF-L	TTT AAG CTT TTA CTA AAA AAT TAT TA	Kuhnert <i>et al.</i> ,(1997)	<i>cnf-1</i>
ECCNF2-R	ACT AAG CTT TAC AAT ATT GAC ATG	Kuhnert <i>et al.</i> ,(1997)	<i>cnf-1</i>
ECFIM-L	GGC GAA TTC TGT TCT GTC GGC TCT GTC	Kuhnert <i>et al.</i> ,(1997)	<i>fimA</i>
ECFIM-R	TTG GAA TTC AAC CTT GAA GGT CGC ATC	Kuhnert <i>et al.</i> ,(1997)	<i>fimA</i>

2.7 Größenstandards

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde die 1 kb DNA-Leiter der Firma MBI Fermentas verwendet.

Als Marker für die Pulsfeldgelelektrophorese wurde die Lambda-Leiter der Firma Bio Labs Inc. verwendet.

3 Methoden

3.1 Isolierung der Bakterienstämme aus Stuhl- und Urinproben

Der Rektalabstrichtupfer wird in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung getaucht und etwas Stuhlmaterial darin suspendiert. Mit 0,9% NaCl wird nun eine Verdünnungsreihe bis 10^{-6} hergestellt. Anschließend werden der Tupfer direkt sowie je 100 μ l der Verdünnungen auf Mc-Conkey-Agarplatten ausgestrichen. Hierbei handelt es sich um einen Selektivnährboden für gram-negative Stäbchen. Von den Urinproben werden 100 μ l direkt sowie ebenfalls Verdünnungen bis 10^{-4} auf Mc-Conkey-Platten ausplattiert. Die Platten werden ÜN bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag sucht man sich die gewünschte Anzahl an Isolaten aus, nimmt sie mit der Öse auf und streicht sie jeweils auf Mc-Conkey- und LB-Agarplatten aus, die wiederum ÜN bei 37°C inkubiert werden.

3.2 Phänotypische Untersuchungen

3.2.1 Hämolyse

Einige *E. coli* Stämme besitzen die Fähigkeit, durch die Bildung von α -Hämolysin humane Erythrozyten zu lysieren. Diese Eigenschaft kann phänotypisch überprüft werden, indem man die zu testenden Stämme auf Blutagarplatten überträgt und ÜN bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag zeigen die hämolytischen Stämme einen charakteristischen hellen Hämolysehof, der ihre Kolonien kreisförmig umgibt und besonders gut im Gegenlicht sichtbar wird.

3.2.2 P-Fimbrien

Die Produktion von P-Fimbrien kann im Hämagglutinationstest mit humanen Erythrozyten geprüft werden.

Dazu verdünnt man gut gewaschenes Humanblut 1:10 mit 0,9% NaCl und gibt davon einen Tropfen auf einen Objektträger. Nun nimmt man mit einem Zahnstocher eine Bakterienkolonie von LB-Agar auf, verreibt diese mit dem Blutstropfen und legt den

Objektträger auf Eis. Bei positiven Stämmen zeigt sich innerhalb von ca. 1 min eine deutliche Hämagglutination.

3.2.3 S-Fimbrien

Zum phänotypischen Nachweis von S-Fimbrien wird ebenfalls ein Hämagglutinationstest wie oben durchgeführt; hierbei werden aber bovine Erythrozyten benötigt.

3.2.4 Typ 1-Fimbrien

Bei diesem Test handelt es sich um eine Mannose-sensitive Hefeagglutination.

2 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt. Aus 20 mg Hefe und 2 ml 0,9% NaCl wird eine Suspension hergestellt. Auf einem ersten Objektträger mischt man gleiche Volumina H₂O, Hefesuspension und ÜN-Kultur und auf einem Zweiten gleiche Volumina 2%ige Mannoselösung, Hefesuspension und ÜN-Kultur durch Rühren mit der Pipettenspitze. Dann betrachtet man die beiden Objektträger unter leichtem Schwenken gegen einen dunklen Hintergrund. Bilden sich hierbei ausschließlich auf dem ersten Objektträger (ohne Mannose) kleine Klümpchen, so gilt die Agglutination als positiv und als spezifischer Nachweis von Typ 1-Fimbrien.

3.3 Isolierung von Gesamt-DNA

Zur Gewinnung der Bakterienzellen aus 1 ml einer LB-ÜN-Kultur wird diese 4 min lang bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wird in 1 ml TNE-Puffer suspendiert, erneut abzentrifugiert und abpipettiert. Nach Zugabe von 270 µl TNEX-Puffer und 30 µl Lysozym (5 mg/ml) wird der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Nun werden 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben, das Gefäß leicht geschwenkt und für mindestens 2 weitere Stunden bei 65°C bis zum völligen Aufklaren der Suspension inkubiert. Zum Ausfällen der DNA werden nun 15 µl 5 M NaCl sowie 500 µl eiskaltes EtOH (100%) zugegeben. Die weiße DNA-Wolke wird dann bei 4°C 10 min lang bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet noch zweimal mit 80% Ethanol gewaschen. Schließlich läßt man die DNA bei geöffnetem Deckel trocknen und löst sie ÜN in 100 µl H₂O_{dest.} im Kühlschrank.

TNE-Puffer: 10mM Tris, pH 8,0
10 mM NaCl
10 mM EDTA

TNEX-Puffer: TNE-Puffer + 1% Triton

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten über Oligonukleotid-Primer mit Hilfe einer DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien. Als Template kann chromosomale DNA aus einer Bakterienkolonie, die für 10 min in 100µl H₂O_{dest.} aufgekocht wurde oder 1:25 verdünnte chromosomale DNA-Lösung benutzt werden.

50 µl Ansatz: 2 µl Template
je 1 µl Primer
46 µl PCR-Supermix (Gibco BRL)

Der Ansatz wird gut gevortext und kurz abzentrifugiert.

Die PCR läuft in drei Reaktionsschritten ab:

Hitzedenaturierung bei 95°C

⇒ Es erfolgt die Trennung der doppelsträngigen DNA.

Annealing

⇒ Die Anlagerung der Primer erfolgt 2°C unter der Schmelztemperatur.

Extension bei 72°C

⇒ Die Primer werden an ihrem 3'OH-Ende mit dNTPs verlängert.

Insgesamt werden diese Schritte ca. 30 mal wiederholt.

Die entstandenen PCR-Produkte werden mittels eines analytischen Gels ausgewertet.

3.4.1 Rep-PCR

Dabei handelt es sich um eine Form des Identitäts-Screenings, da der benutzte Primer an repetitive Sequenzen (repetitive extragenic palindromic elements) bindet, die in unterschiedlichen Abständen voneinander im Genom von *E. coli* lokalisiert sind (Versalovic *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 1993). Somit ergibt sich bei der Auftrennung der amplifizierten Fragmente mittels Gelelektrophorese ein für den jeweiligen Stamm charakteristisches Bandenmuster.

Für die **Rep-PCR** gelten folgende Bedingungen:

50 µl Ansatz: 30 µl H₂O_{bidest.}

5 µl 10xPuffer

5 µl DMSO

4 µl MgCl₂

2 µl dNTPs 10 mmol

2 µl Template

1 µl Primer Rep1R-I

1 µl Taq DNA Polymerase (Boehringer Mannheim)

Erste Denaturierung: 7 min, 95°C

30 Zyklen: Denaturierung (1.step): 30 s, 90°C

Annealing (2.step): 1 min, 40°C

Extension (3.step): 8 min, 65°C

Letzte Extension: 16 min, 65°C

Für das Agarosegel wird 1x TAE-Puffer mit 1,5% Agarose verwendet.

3.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle tragen eine negative Ladung und wandern deswegen im elektrischen Feld zum positiven Pol (Anode). Mit der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese ist eine Auftrennung im Größenbereich von 100 bp bis 60 kb möglich, da unterschiedliche Agarosekonzentrationen (0,3-2,0%) zu unterschiedlichen Porengrößen führen. Die

Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente hängt dabei von der Molekülgröße, der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und der DNA-Konformation ab.

Die Agarose wird in der gewünschten Konzentration abgewogen, zu 100 ml Laufpuffer gegeben und in der Mikrowelle so lange gekocht, bis die Agarose vollkommen gelöst ist. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wird die Lösung in die abgedichtete Gelkammer gegossen und der Kamm eingesetzt. Das Gel muß ca. 45 min abkühlen. Dann kann der Kamm herausgezogen, das Gel in die entsprechende Elektrophoresekammer gelegt und mit Laufpuffer überschichtet werden. Die Proben werden mit Stop-Puffer versetzt und aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wird das Gel in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) für 15 min gefärbt und unter UV-Licht angeschaut.

10x Stop-Puffer: 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanon
 25% Ficoll, Typ 400
 ad 10 ml H₂O_{dest.}

3.6 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

3.6.1 Isolierung von High Molecular Weight DNA

Eine Voraussetzung für die Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese ist die Verwendung von unbeschädigter Gesamt-DNA (HMW-DNA). Bei der herkömmlichen DNA-Isolierung treten durch mechanische Scherkräfte häufig Strangbrüche auf. Durch die Einbettung der Bakterien in LGT-Agarose vor der DNA-Isolierung wird dies vermieden.

4 ml LB-Medium werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt. Die Hälfte der ÜN-Kultur wird in einem 2 ml-Eppendorfcap 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert, die zweiten 2 ml dazugegeben und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit SE-Puffer gewaschen und wieder in 1 ml SE-Puffer aufgenommen. Davon werden 100 µl mit 900 µl SE-Puffer gemischt und die Extinktion bei 600 nm gemessen. Die OD₆₀₀ sollte zwischen 0.6 und 0.8 liegen, gegebenenfalls muß entsprechend verdünnt werden.

Zum Gießen der Blöckchen werden 2 Aluminiumschienen ineinander gelegt und am Ende mit Abstandhaltern versehen, so daß eine Rinne entsteht. Zum Einbetten der Bakterien wird 2% LGT-Agarose verwendet. Die Agarose wird aufgekocht und nach kurzem Abkühlen werden 900 µl Bakteriensuspension mit 900 µl Agarose gemischt und schnell in die vorbereitete Schiene einpipettiert. Nach Erstarren der Agarose im Kühlschrank werden kleine Blöckchen zugeschnitten und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, das 5 ml NDS-Lösung und 10 mg Proteinase K enthält. Die Röhrchen werden ÜN bei 50°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Diese Behandlung bewirkt die Zelllyse und Reinigung der DNA.

Zur Entfernung der Proteinase K, die die Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen behindern würde, werden die Agaroseblöckchen viermal mit TE-Puffer pH 7,5 (je 10 ml) gewaschen. Nach jeweils 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln wird der TE-Puffer gewechselt. Die Blöckchen können dann in TE-Puffer längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden. Blöckchen mit genomischer DNA von *E. coli* Bakterien sollten erst nach einer Woche zur Restriktionsspaltung verwendet werden.

SE-Puffer: 75 mM NaCl
25 mM EDTA, pH 7,4

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,5
5 mM EDTA, pH 7,5

NDS-Puffer: 0,5 M EDTA, pH 9,5
1% N-Laurylsarcosin
2 mg/ml Proteinase K, frisch zugegeben

LGT-Agarosepuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM MgCl₂
0,1 mM EDTA, pH 7,5
2% LGT-Agarose

3.6.2 Restriktionsspaltung von High Molecular Weight DNA

Vor der Restriktionsspaltung der DNA-Agaroseblöckchen muß der TE-Puffer aus den Blöckchen entfernt werden, da das EDTA die Spaltung mit Restriktionsenzymen stören würde. Für die Spaltung mit dem Restriktionsenzym *XbaI* werden die Blöckchen in 2 ml Eppendorf-caps 1 h lang bei 50°C in 1 ml Universalvorpuffer vorinkubiert. Anschließend wird der Puffer von den Blöckchen entfernt und durch 150 µl des eigentlichen Spaltpuffers ersetzt. Die Blöckchen werden unter Zugabe von 30 U *XbaI* 3 h bei 37°C gespalten. Um die Inkubation zu beenden, werden 10µl Stop-Puffer hinzugegeben.

Nun können die Restriktionsfragmente im Pulsfeldgel aufgetrennt werden. Dazu wird aus 0,5x TBE-Puffer und einer Agarosekonzentration von 0,8% ein Gel gegossen und nach dem Erkalten der Kamm herausgezogen. Nun können die Blöckchen in die Taschen gegeben und mit 1% Agarose überschichtet werden. Das Pulsfeldgel wird in die Elektrophoresekammer gelegt und gestartet.

10x UNI-Vorpuffer: 330 mM Tris-Acetat (pH 7,9 mit Essigsäure einstellen)

660 mM K-Acetat

100 mM Mg-Acetat

4 Ergebnisse

Von 11 Patientinnen, die unter chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden, wurden insgesamt 252 *E. coli*-Isolate aus Stuhl- und Urinproben angezüchtet und untersucht. Es handelt sich dabei um eine Kooperation mit Prof. Dr. R. Fünfstück von der Friedrich-Schiller-Universität in Jena, der die Patientinnen betreute und die Stuhl- und Urinproben zur Verfügung stellte. Die Patientinnen wurden in dieser Arbeit über einen Zeitraum von 10 Monaten (Januar bis Oktober 1998) beobachtet.

Die Patientinnen dieser Studie wurden mit arabischen Zahlen durchnummeriert, wobei einige Patientinnen von einer vorangehenden Studie von Frau Brauchle übernommen wurden und andere neu hinzugekommen sind, so daß sich eine unregelmäßige Zahlenfolge ergibt (Brauchle, 2002). Die Abnahmedaten, an denen die Stuhl- bzw. Urinproben gewonnen wurden, sind zur Vereinfachung mit Großbuchstaben versehen worden. Dabei wurde der Buchstabe J ausgelassen, um eine Verwechslung mit dem Abnahmedatum I zu vermeiden. Schließlich wurden die *E. coli*- Isolate einer Probe wiederum durchnummeriert und die Urinisolate im Gegensatz zu den Stuhlisolaten zusätzlich mit einem U versehen. Setzt man die einzelnen Komponenten zusammen, ergibt sich daraus die Stamm-Nummer der einzelnen Isolate.

Beispiel: Die Stamm-Nr. 1G4 steht für das Stuhlisolat Nr. 4 der Patientin Nr. 1, das am Abnahmedatum G, also am 21.01.98 isoliert wurde. Das dritte Urinisolat der Patientin Nr. 2 vom 21.10.98 (Abnahmedatum K) erhält somit die Stamm-Nr. 2K3U.

Aus den aus Jena erhaltenen Stuhl- und Urinproben wurden, soweit möglich, jeweils sechs *E. coli*-Isolate gewonnen. Insgesamt wurden so 166 Stuhl- und 86 Urinisolate angezüchtet. Diese wurden sowohl geno- als auch phänotypisch näher untersucht. Mit Hilfe der PCR erfolgte eine Überprüfung der Stämme auf die Gencluster der folgenden Virulenzfaktoren: α -Hämolyisin (*hly*), P- (*pap/prs*), S- (*sfa/foc*) und Typ-1- (*fim*) Fimbrien sowie den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 (*cnf-1*). Die in Klammern angegebenen Abkürzungen für die jeweiligen Gencluster werden im Folgenden beibehalten. Konnte keiner dieser Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen werden, wird in

dieser Arbeit von apathogenen *E. coli*-Isolaten gesprochen. Zusätzlich wurde die Fähigkeit zur Hämolyisin- und Fimbrienproduktion auch phänotypisch getestet.

Weiterhin wurden sämtliche *E. coli*-Isolate durch die Rep-PCR differenziert. Dabei handelt es sich um eine Form des Identitäts-Screenings, da der benutzte Primer an repetitive Sequenzen (repetitive extragenic palindromic elements) bindet, die in unterschiedlichen Abständen voneinander im Genom von *E. coli* lokalisiert sind (Versalovic *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 1993). Somit ergibt sich bei der Auftrennung der amplifizierten Fragmente mittels Gelelektrophorese ein für den jeweiligen Stamm charakteristisches Bandenmuster. Die verschiedenen Muster wurden mit arabischen Zahlen fortlaufend durchnummeriert, wobei die *E. coli*-Isolate der vorangegangenen Studie von Frau Brauchle miteinbezogen wurden (Brauchle, 2002).

In dieser Studie gelten per definitionem alle Isolate einer Patientin, die in der PCR die gleiche Kombination an Pathogenitätsfaktoren tragen und in der Rep-PCR das gleiche, charakteristische Bandenmuster zeigen, als identisch und werden somit zu einem Klon zusammengefaßt.

Die 166 isolierten Stuhlstämmen lassen sich demnach zu 46 Klonen und die 86 Urinisolate zu 16 verschiedenen Klonen zusammenfassen.

Mindestens zwei Isolate eines Klons (soweit vorhanden) wurden weiterhin in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gegeneinander aufgetragen, um eine weitere Aussage zur Identität der Stämme und zu möglichen Deletionsereignissen *in vivo* machen zu können. Bei dieser Methode wird die Gesamt-DNA der Bakterien mit Hilfe des Restriktionsenzym *XbaI* gespalten und die Restriktionsfragmente im Pulsfeldgel aufgetrennt. Man erhält wiederum ein für den jeweiligen Stamm charakteristisches Bandenmuster, welches mit römischen Zahlen versehen wurde. Die Abkürzung n.a. (nicht auswertbar) in diesem Zusammenhang bedeutet, daß in der Pulsfeldgelelektrophorese die DNA des entsprechenden *E. coli*-Isolats auch nach mehrmaliger Isolierung von Gesamt-DNA ein Schmiermuster zeigte.

Die jeweiligen Ergebnisse der genotypischen und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der einzelnen Isolate sind den Tabellen 14-24 im Anhang zu entnehmen.

4.1 Einzelauswertung der Patientinnen

Zunächst werden in dieser Arbeit die verschiedenen Klone mit ihren jeweiligen genotypischen Eigenschaften und den Ergebnissen aus den Identitäts-Screening-Untersuchungen der einzelnen Patientinnen unter Berücksichtigung der Klinik und der Therapie beschrieben. Bezüglich der Klinik werden im wesentlichen drei Aktivitätsphasen unterschieden: Eine inaktive und eine aktive Phase sowie die asymptomatische Bakteriurie (ABU) (s.a. Kap.4.4).

Zusätzlich liegen Daten zur Antikörperbeladung (ACB), Zytoadhärenz (Zyto) und Vitalität der Leukozyten (Leuko) im Urin vor, die freundlicherweise von der Klinik für Innere Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt wurden. Dabei werden die in Klammern angegebenen Abkürzungen beibehalten.

ACB: Antikörperbeladung: Dieser Wert gibt an, wieviel Prozent der im Urin vorkommenden Bakterien mit Antikörpern beladen sind.

Zyto: Zytoadhärenz: Dieser Wert gibt an, wieviel Prozent der im Urin vorkommenden Plattenepithelien mit mehr als 20 Bakterien beladen sind.

Leuko: Vitalität der Leukozyten: Dieser Wert gibt an, wieviel Prozent der im Urin vorkommenden Leukozyten noch vital sind.

Die Abkürzung z.w. (zu wenig) bedeutet in diesem Zusammenhang, daß der betreffende Wert nicht zu bestimmen war, da sich im Urin zu wenige Bakterien, Plattenepithelien bzw. Leukozyten befanden.

4.1.1 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 1 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 3 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 1 aufgetretenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 3 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 1

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
21.01.98(G)	1G1-6U	+	+	+	+	+	12	XIII
01.04.98(H)	1H1,4-6							
21.01.98(G)	1G1-6	+	-	+	+	-	13	XIV
01.04.98(H)	1H2,3	-	-	-	+	-	14	XV
	1H1-6U	+	+	+	+	+	15	XIII
17.07.98(I)	1I2-5							
	1I1-8U							
	1I1	+	+	+	+	+	16	XIII
08.10.98(K)	1K1-4	-	+	-	+	-	17	XVI, XVII
	1K5,6	-	-	-	+	-	18	XVIII
	1K1-3,6U	-	+	-	+	-	19	XVI, XXI
	1K4,5U	-	-	-	+	-	20	XIX, XX

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfa/foc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)

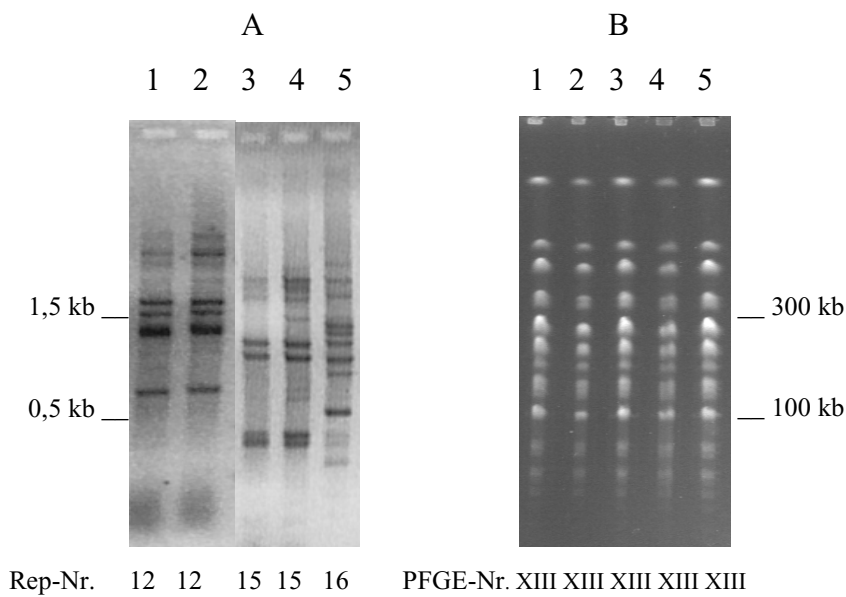


Abb. 3 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolatn der Pat. 1. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (1G1U), 2 (1H5), 3 (1H4U), 4 (1I7U), 5 (1I1). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 3 ersichtlich.

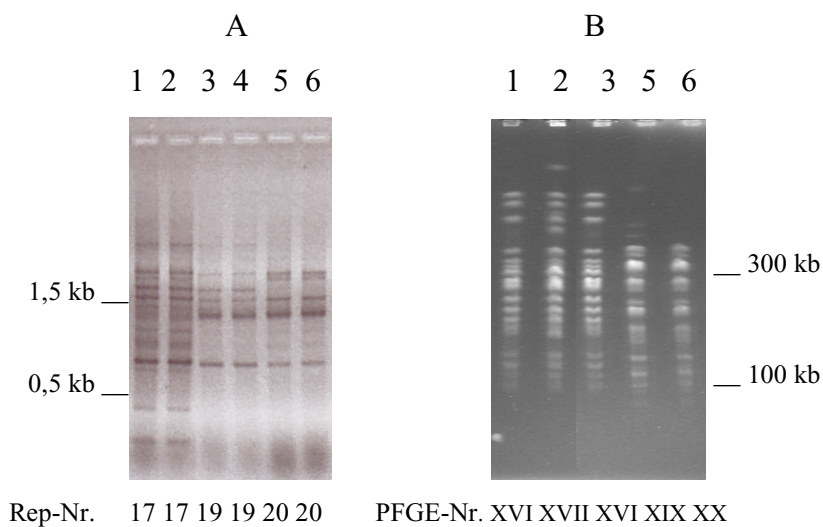


Abb. 4 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolatn der Pat. 1. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (1K1), 2 (1K3), 3 (1K2U), 4 (1K6U), 5 (1K4U), 6 (1K5U). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 3 ersichtlich.

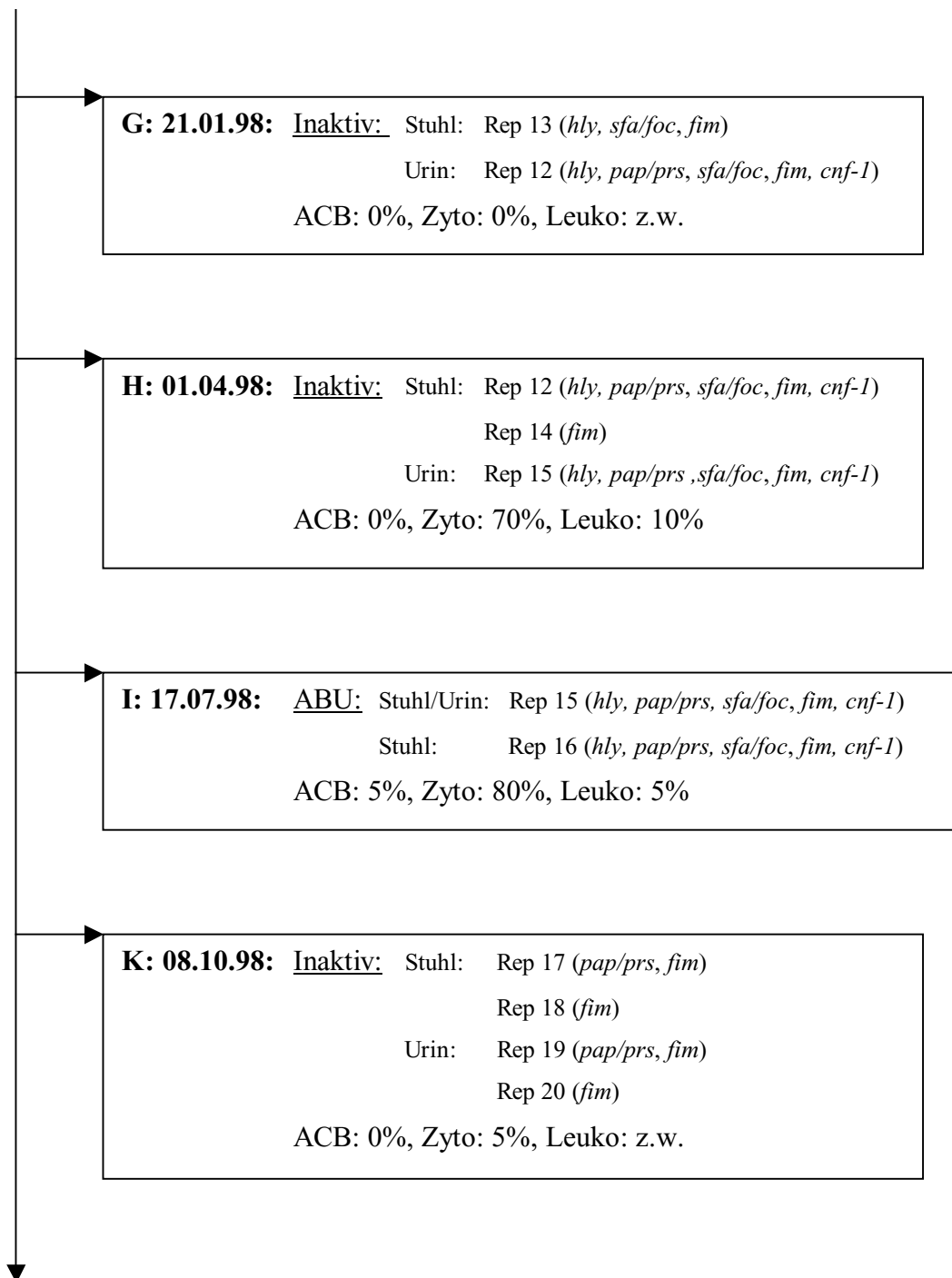


Abb. 5 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 1)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Sowohl am 21.01.98 (Abnahmedatum G) als auch am 01.04.98 (Abnahmedatum H) wurde ein hämolysierender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 12 isoliert, der sich in der PCR außerdem positiv für die P-, S- und Typ-1-Fimbriengencluster und das *cnf-1*-Gen zeigte. Somit persistierte dieser Klon über 2 Monate hinweg, in denen die Patientin jedoch keinerlei Beschwerden hatte. Bereits am 05.11.97 (Abnahmedatum F) hatten sich Isolate mit dem gleichen Bandenmuster in der Rep-PCR anzüchten lassen, bei diesen ließ sich jedoch keine S-Fimbrien-Produktion nachweisen. Am 21.01.98 zeigte sich in der Stuhlprobe ein ebenfalls hämolysierender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 13 (PFGE-Muster XIV), der auch das S- und Typ-1-Fimbriengencluster besaß. Am folgenden Abnahmedatum H ließen sich Isolate des Klons mit dem Rep-Muster Nr. 14 (PFGE-Muster XV) anzüchten, die in der PCR für *fim* positiv waren. Ebenfalls an diesem Tag fand sich in der Urinprobe ein Klon mit dem Rep-Muster Nr. 15, bei dem in der PCR die *hly*-, P-, S-Fimbrien- und *fim*-Gencluster sowie das *cnf-1*-Gen nachgewiesen werden konnten. Da dieser Klon am 17.07.98 (Abnahmedatum I) sowohl aus Stuhl als auch aus Urin angezüchtet werden konnte, persistierte er über drei Monate hinweg. Zu diesem Zeitpunkt stellte man im Urin der Patientin eine asymptomatische Bakteriurie fest. In der Pulsfeldgelelektrophorese besaß dieser Klon interessanterweise das gleiche Bandenmuster wie die Klone mit den Rep-Mustern Nr. 12 und Nr. 16 (PFGE-Muster XIII). Auch in der Kombination ihrer Pathogenitätsfaktoren stimmten diese drei Klone überein. Am Abnahmedatum K (08.10.98) ließen sich schließlich je zwei Stuhl- und Urinklone isolieren: Ein P- und Typ-1-Fimbrien tragender Stuhklon mit dem Rep-Muster Nr.17 (PFGE-Muster XVI und XVII) und ein in der PCR *fim* positiver Klon mit dem Rep-Muster Nr. 18 (PFGE-Muster XVIII). In der Urinprobe fand sich ein Klon mit dem Rep-Muster Nr. 19, der die Gencluster für P- und Typ-1-Fimbrien besaß. Auch innerhalb dieses Klons zeigten einzelne Isolate unterschiedliche Bandenmuster in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE-Muster XVI und XXI). Und auch beim zweiten Typ-1-Fimbrien tragenden Urinklon mit dem Rep-Muster Nr. 20 traten verschiedene PFGE-Bandenmuster auf (PFGE-Muster XIX und XX).

4.1.1.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

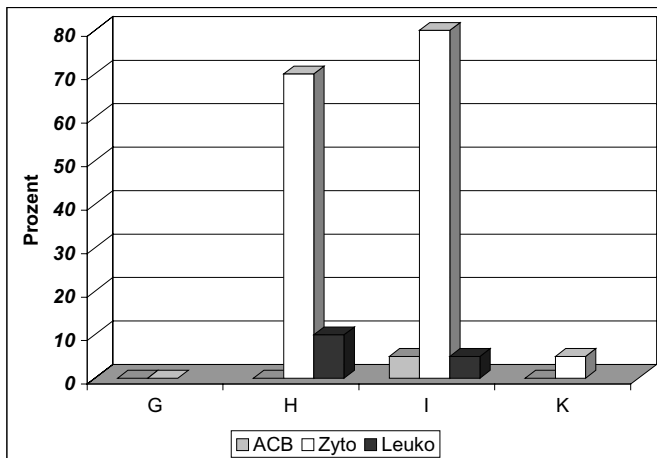


Abb. 6 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin (Pat. Nr. 1)

Die Antikörperbeladung betrug an den drei Abnahmetagen der inaktiven Phase G, H und K jeweils 0%. Am 17.07.98, als im Urin der Patientin eine signifikante Bakteriurie festgestellt wurde, stieg dieser Wert auf 5% an.

Der Zytoadhärenzwert dagegen zeigte große Schwankungen. Er betrug am 21.01.98 noch 0%, am folgenden Abnahmetag H jedoch 70%. Ähnlich hoch, nämlich 80%, war er am 17.07.98, um dann wiederum bis zum 08.10.98 auf 5% abzufallen.

Am 01.04.98 waren 10% der im Urin vorkommenden Leukozyten noch vital, am 17.07.98 sank der Anteil vitaler Zellen auf 5% ab.

An den Abnahmedaten G und K befanden sich jeweils zu wenige Leukozyten im Urin, um diesen Wert bestimmen zu können.

4.1.2 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 2 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 4 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 2 vorgefundenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 4 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr.2

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfafoc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
08.04.98(H)	2H1-6U	-	-	-	+	-	11	n.a.
17.07.98(I)	2I1-6U							
17.07.98(I)	2I1-4	-	-	+	+	-	12	XI
	2I5,6	-	-	+	+	-	13	XI
21.10.98(K)	2K1	-	-	-	+	-	14	XII
	2K2-4	-	-	-	+	-	15	XIII
	2K5,6	-	-	+	+	-	16	XI
	2K1-6U	-	-	-	+	-	17	XIV, n.a.

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfafoc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters), n.a. (nicht auswertbar)

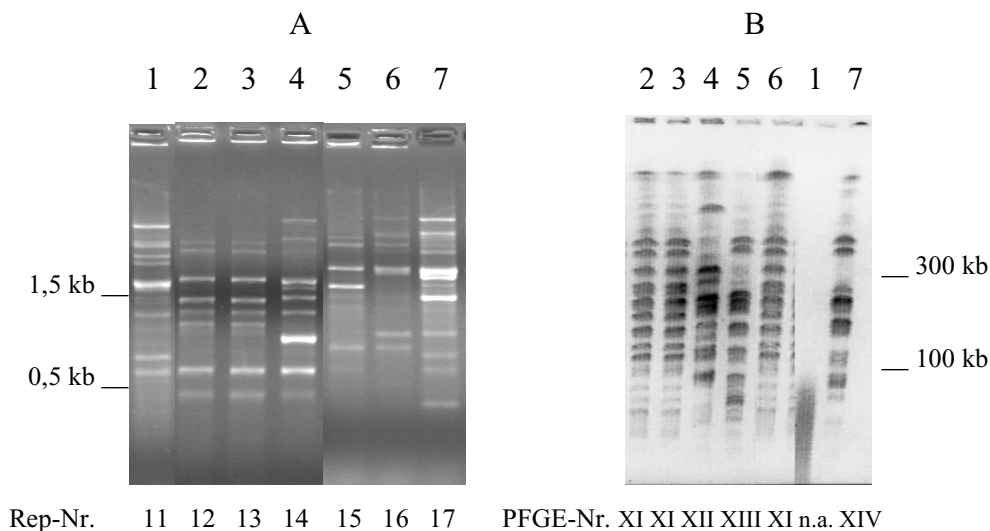


Abb. 7 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolaten der Pat. 2. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (2H1U), 2 (2I1), 3 (2I5), 4 (2K1), 5 (2K2), 6 (2K5), 7 (2K3U). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 4 ersichtlich.

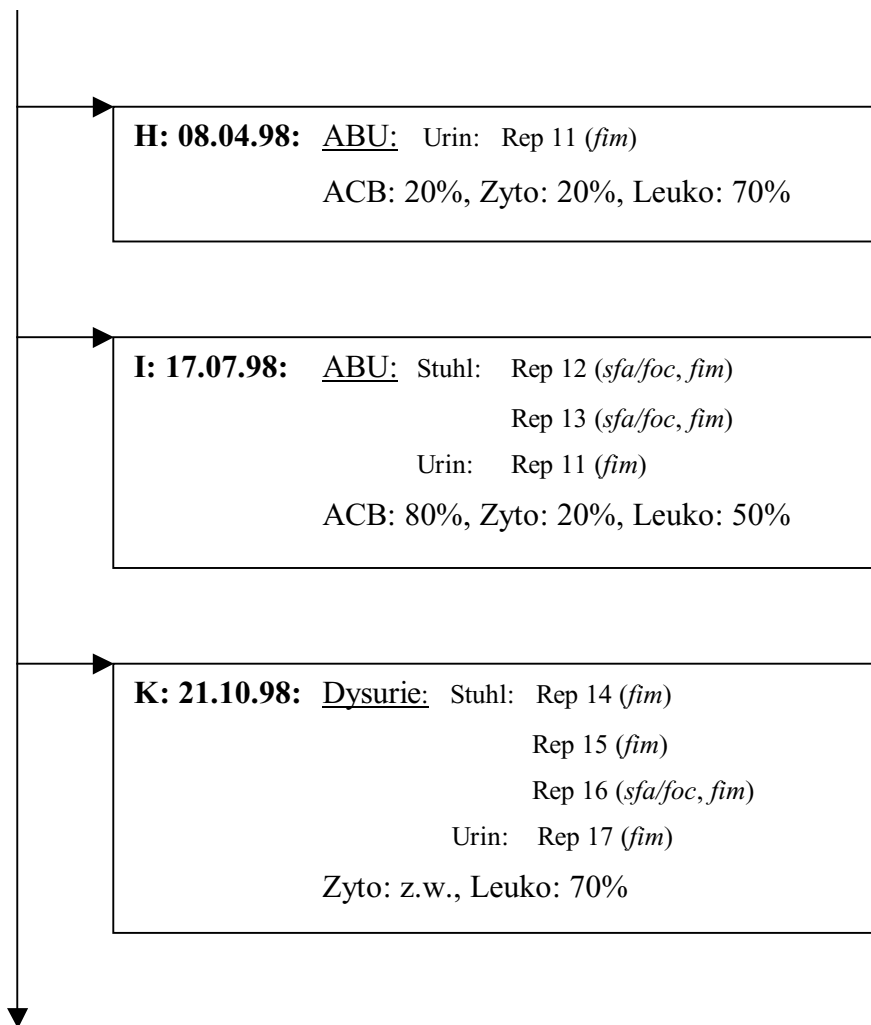


Abb. 8 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 2)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbelastung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Am 08.04.98 (Abnahmedatum H) fand sich im Urin dieser Patientin ein einziger Klon mit dem Rep-Muster Nr. 11, bei dem in der PCR das *fim*-Gencluster nachgewiesen werden konnte. Dieser Klon war bereits am 07.01.98 (Abnahmedatum G) aufgetreten und persistierte weiter bis zum 17.07.98, so daß er insgesamt über sechs Monate im Urin gefunden wurde, allerdings nie aus Stuhlproben isoliert werden konnte. In der PFGE zeigte die DNA dieses Klons leider ein Schmiermuster, so daß er nicht auswertbar war. Wie bereits am 08.04.98 stellte man auch am darauffolgenden Abnahmedatum I (17.07.98) eine signifikante Bakteriurie fest. Da die Patientin jedoch keine Beschwerden angab (ABU), erfolgte auch, wie in dieser Situation üblich, keine

Therapie. Im Stuhl fanden sich zu diesem Zeitpunkt zwei Klone mit den Rep-Mustern Nr. 12 und Nr. 13, die beide das S- und Typ-1-Fimbriengencluster trugen. Am 21.10.98, als die Patientin über Dysurie klagte, konnten aus einer Stuhlprobe die Typ-1-Fimbrien tragenden Klone mit den Rep-Mustern Nr. 14 (PFGE-Muster XII) und Nr. 15 (PFGE-Muster XIII) isoliert werden. Außerdem zeigte sich der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 16, der außer dem Typ 1- auch das S-Fimbriengencluster besaß. Interessanterweise besaßen die Klone mit den Rep-Mustern Nr. 12, Nr. 13 und Nr. 16 in der PFGE das gleiche Bandenmuster XI und stimmten auch in ihrer Pathogenitätsfaktorkombination überein. Betrachtet man die phänotypische Expression dieser Stämme, so fällt auf, daß die Isolate der Klone mit den Rep-Mustern Nr. 12 und Nr. 13 die Typ 1- und S-Fimbrien auch wirklich exprimierten, während die phänotypischen Versuche bei den Isolaten des Klons mit dem Rep-Muster Nr. 16 negativ ausfielen. Im Urin ließ sich ein einziger, in der PCR *fim* positiver Klon nachweisen, der in der Rep-PCR das Bandenmuster Nr. 17 zeigte. Die zwei in der Pulsfeldgelelektrophorese untersuchten Isolate zeigten das Bandenmuster XIV sowie ein nicht auswertbares Schmiermuster (n.a.).

4.1.2.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

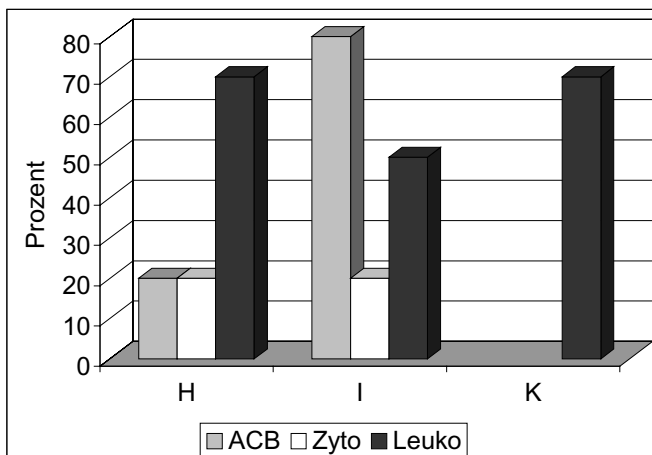


Abb. 9 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin (Pat. Nr. 2)

An den Abnahmedaten H und I, an denen sich bei der Patientin eine signifikante Bakteriurie feststellen ließ, waren 20% bzw. sogar 80% der im Urin vorkommenden Bakterien mit Antikörpern beladen. Als die Patientin über Dysurie klagte (Abnahmedatum K), wurde dieser Wert leider nicht bestimmt.

Der Zytoadhärenzwert, der am 08.04. und am 17.07.98 jeweils 20% betrug, konnte am 21.10.98 nicht bestimmt werden, da sich zu wenig Plattenepithelien im Urin befanden.

Der Anteil der vitalen Leukozyten im Urin war zu jedem Abnahmezeitpunkt sehr hoch. Er betrug am 17.07.98 50% und an den anderen beiden Tagen jeweils sogar 70%.

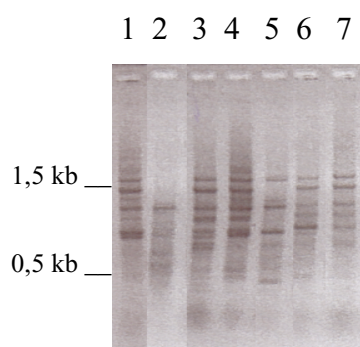
4.1.3 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 3 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 5 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 3 aufgetretenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 5 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 3

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
28.01.98(I)	3I1,3,4	-	-	-	+	-	13	XII
	3I2,6	-	-	-	-	-	14	XIII
25.02.98(M)	3M3,5							
28.01.98(I)	3I5	-	-	-	+	-	14	XIII
04.02.98(K)	3K1,3-5	-	-	-	+	-	15	XIV
04.02.98(K)	3K2	-	-	-	+	-	5	V
12.02.98(L)	3L1-6							
11.03.98(N)	3N2,5,6							
22.04.98(O)	3O2,4-6							
	3O1-6U							
25.02.98(M)	3M1,2,4,6	-	-	-	+	-	16	XV
11.03.98(N)	3N1,3,4	-	-	-	-	-	17	XVI
22.04.98(O)	3O1,3	+	-	+	+	-	18	XVII

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfa/foc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)



Rep-Nr. 13 14 15 5 16 17 18

Abb. 10 Darstellung der Rep-PCR-Muster von Isolaten der Pat. 3.

Die PCR-Produkte folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen:

1 (3I1), 2 (3M3), 3 (3K1), 4 (3K2), 5 (3M1), 6 (3N1), 7 (3O1).

Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 5 ersichtlich.

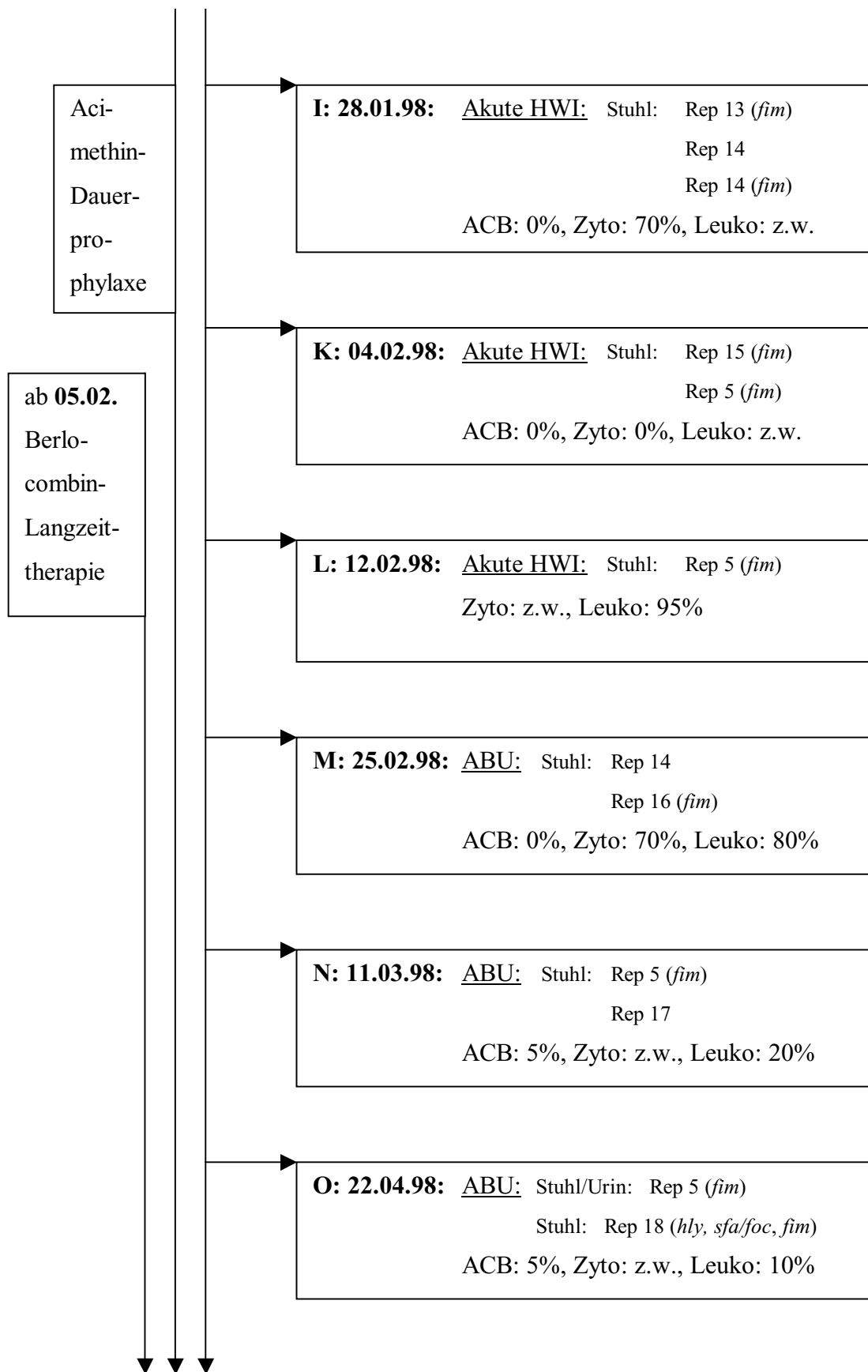


Abb. 11 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter

Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 3)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Diese Patientin, die über den gesamten Beobachtungszeitraum eine Acimethin-Prophylaxe erhielt, litt dennoch am 28.01.98 unter einer akuten Harnwegsinfektion. An diesem Tag konnten drei verschiedene Klone aus dem Stuhl isoliert werden. Ein Typ-1-Fimbrien tragender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 13 (PFGE-Muster XII) sowie zwei Klone mit den Rep-Mustern Nr.14, die auch in der PFGE das gleiche Bandenmuster ergaben (PFGE-Muster XIII). Sie unterscheiden sich jedoch im Besitz des *fim*-Genclusters, und sind deshalb nicht identisch. Auch am 04.02.98 klagte die Patientin noch über Beschwerden, so daß zunächst eine Antibiotikatherapie (Berlocombin®) eingeleitet wurde, die dann als Antibiotikalangzeitprophylaxe über sechs Monate beibehalten wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurden der Typ-1-Fimbrien produzierende Klon mit dem Rep-Muster Nr. 15 (PFGE-Muster XIV) und der ebenfalls in der PCR *fim* positive Klon mit dem Rep-Muster Nr. 5 (PFGE-Muster V) isoliert. Letzterer war bereits am 23.07.97 (Abnahmedatum C), am 22.10.97 (Abnahmedatum D), am 30.10.97 (Abnahmedatum E), am 26.11.97 (Abnahmedatum G) und am 17.12.97 (Abnahmedatum H) nachgewiesen worden. Weiterhin fand er sich am 12.02.98, an dem die Patientin immer noch unter dem akuten Infekt litt, am 11.03.98 (ABU) und am 22.04.98 (ABU), so daß er insgesamt über einen Zeitraum von neun Monaten persistierte. Am 25.02.98 (Abnahmedatum M) dagegen ließ sich der apathogene Klon mit dem Rep-Muster Nr.14, der schon am 28.01.98 gefunden worden war, aus einer Stuhlprobe gewinnen. Ebenso an diesem Tag wurde ein neuer Klon mit dem Rep-Muster Nr. 16 (PFGE-Muster XV) isoliert, der sich in der PCR positiv für das Typ-1-Fimbriengencluster zeigte. Aus dem Stuhl der Patientin, die mittlerweile zwar beschwerdefrei geworden war, im Urin aber weiterhin eine signifikante Bakteriurie aufwies, konnte am 11.03.98 (Abnahmedatum N) neben dem schon erwähnten Klon mit dem Rep-Muster Nr.5 noch ein weiterer apathogener Klon mit dem Rep-Muster Nr. 17 (PFGE-Muster XVI) angezüchtet werden. Auch am 22.04.98 (Abnahmedatum O) fand sich außer dem bekannten, persistierenden Klon ein neuer hämolytischer Klon, der

zusätzlich S- und Typ-1-Fimbrien produzierte, und in der Rep-PCR das Bandenmuster Nr. 18 und in der Pulsfeldgelelektrophorese das Muster XVII zeigte.

4.1.3.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

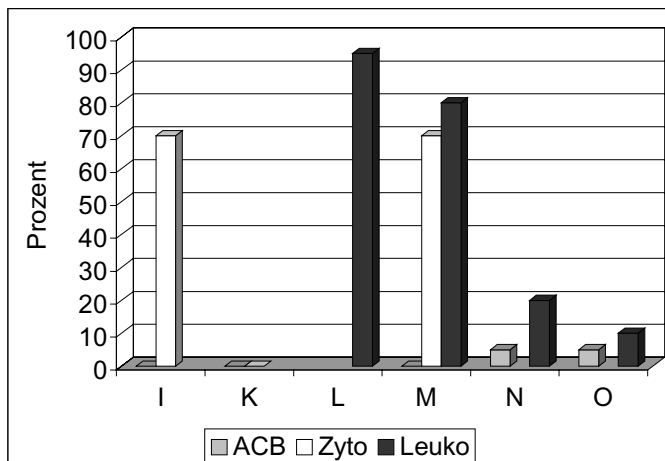


Abb. 12 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin (Pat. Nr. 3)

An den Abnahmetagen I, K und M waren die im Urin vorkommenden Bakterien nicht mit Antikörpern beladen, der ACB-Wert betrug somit 0%. Am 12.02.98 (Abnahmedatum L) wurde dieser Wert nicht bestimmt, am 11.03. und am 22.04.98 stieg die Antikörperbeladung auf jeweils 5% an.

Zu Beginn des Harnwegsinfektes (28.01.98) waren 70% der im Urin vorkommenden Plattenepithelien mit mehr als 20 Bakterien beladen, sieben Tage später (Abnahmedatum K) betrug der Zytoadhärenzwert 0%, und am 25.02.98 wiederum 70%.

An den übrigen Abnahmedaten konnte der Wert nicht bestimmt werden, da sich nicht genügend Plattenepithelien im Urin befanden.

Am 28.01. und am 04.02.98 waren zu wenig Leukozyten im Urin, um deren Vitalität beurteilen zu können, obwohl die Patientin unter einem Infekt litt.

Am folgenden Abnahmedatum L aber zeigten sich 95% der Leukozyten noch vital. Dieser Wert sank dann wieder kontinuierlich zunächst auf 80% (Abnahmetag M), dann auf 20% (Abnahmetag N) und schließlich auf 10% (Abnahmetag O) ab.

4.1.4 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 5 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 6 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 5 vorgefundenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 6 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 5

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
25.03.98(C)	5C1-6	-	-	-	+	-	6	VII
	5C1-6U	+	+	+	+	+	7	VI

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfa/foc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)

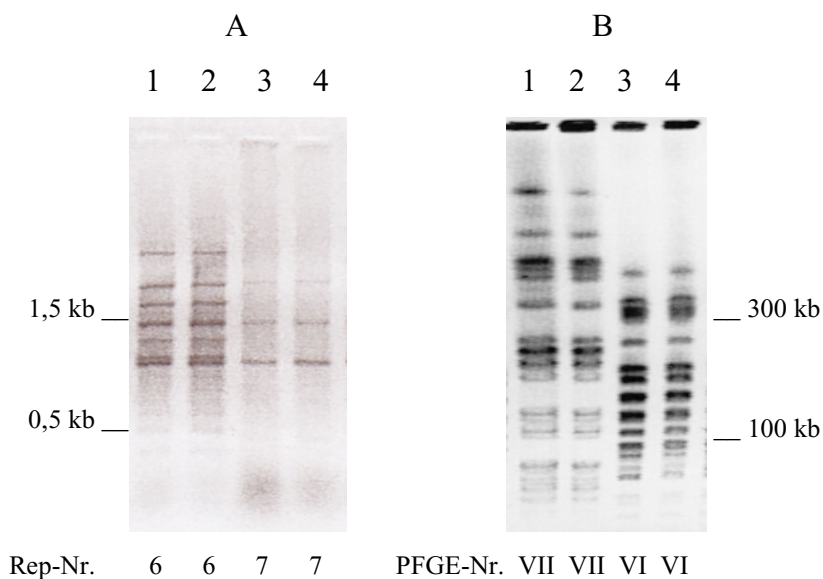


Abb. 13 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolaten der Pat. 5. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (5C1), 2 (5C6), 3 (5C1U), 4 (5C6U). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 6 ersichtlich.

Bei der Patientin Nr. 5 liegen nur Isolate vom 25.03.98 (Abnahmedatum C) vor, als sich zwar eine signifikante Bakteriurie fand, sie aber über keine Beschwerden klagte (ABU), so daß keine Therapie erfolgte. Im Stuhl fand sich ein einziger Typ-1-Fimbrien tragender Klon, der in der Rep-PCR das Bandenmuster Nr. 6 und in der Pulsfeldgelelektrophorese das Muster VII zeigte. Dieser Klon war auch schon in der Stuhlprobe vom 10.12.97 (Abnahmedatum B) gefunden worden, er persistierte also über 3 Monate hinweg. Auch der im Urin gefundene Klon mit dem Rep-Muster Nr. 7 (PFGE-Muster VI) wurde sowohl am 10.12.97 als auch am 25.03.98 isoliert. Er zeigte sich in der PCR für *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* positiv.

4.1.4.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

Am 25.03.98 konnte keine Antikörperbeladung der Bakterien nachgewiesen werden und der Zytoadhärenzwert lag bei 20%.

Die Leukozytenvitalität konnte nicht beurteilt werden, da sich zu wenige Leukozyten im Urin befanden.

4.1.5 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 8 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 7 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 8 vorgefundenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 7 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 8

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
11.03.98(F)	8F1,5	-	-	-	+	-	13	X
	8F2	-	-	-	+	-	14	XI
	8F3,6	-	-	-	-	-	15	n.a.
	8F4	-	-	-	-	-	16	XII
01.10.98(G)	8G1,4-6	-	+	-	+	-	17	XIII
	8G2	+	+	+	-	+	18	XIV
	8G3	+	+	+	+	+	18	XV
	8G1-6U							

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfa/foc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters), n.a. (nicht auswertbar)

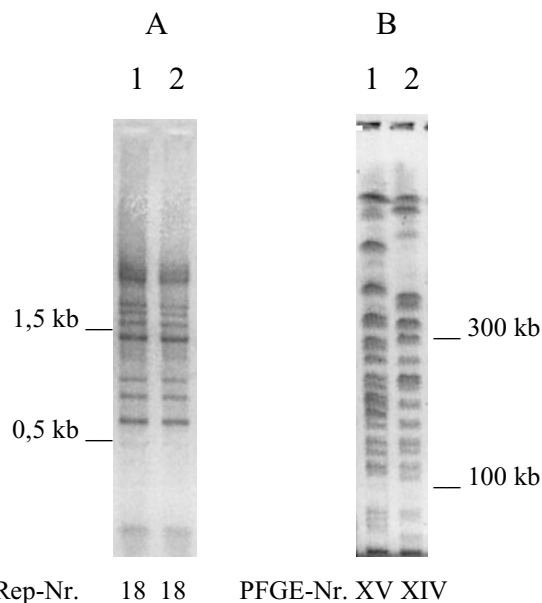


Abb. 14 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolaten der Pat. 8. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (8G1U), 2 (8G2). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 7 ersichtlich.

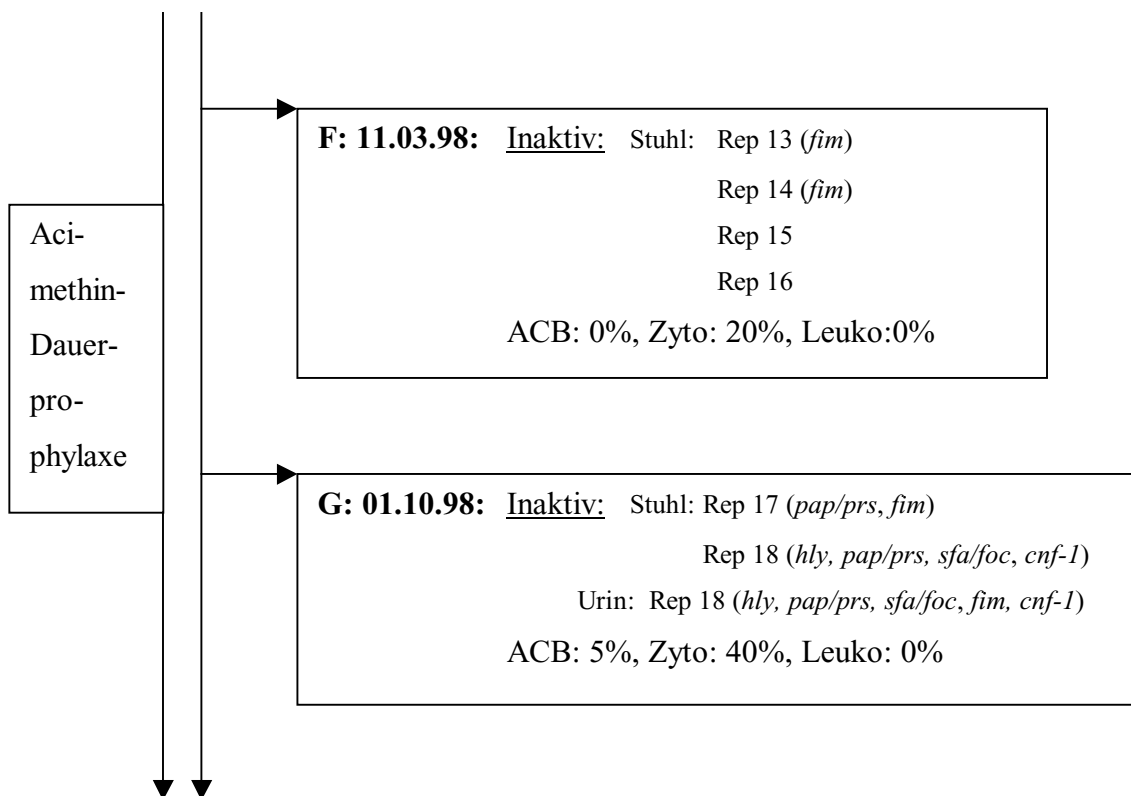


Abb. 15 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 8)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Bei dieser Patientin, die dauerhaft eine Acimethinprophylaxe einnahm, traten im Untersuchungszeitraum keinerlei Beschwerden auf. Am ersten Abnahmetag F (11.03.98) konnten vier verschiedene Klone aus der Stuhlprobe gewonnen werden. Die Klone mit den Rep-Bandenmustern Nr. 13 (PFGE-Muster X) und Nr. 14 (PFGE-Muster XI) trugen jeweils das *fim*-Gencluster, bei den Klonen mit den Rep-Mustern Nr. 15 (PFGE-Muster n.a.) und Nr. 16 (PFGE-Muster XII) konnte keiner der in dieser Studie untersuchten Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen werden. Am 01.10.98 (Abnahmedatum G) wurden schließlich drei verschiedene Klone isoliert. In der Stuhlprobe fand sich ein P- und Typ-1-Fimbrien bildender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 17 (PFGE-Muster XIII) sowie zwei Klone mit den Rep-Mustern Nr. 18 (PFGE-Muster XIV und XV), bei denen in der PCR die Gencluster für α -Hämolyisin, P- und S-

Fimbrien und das *cnf-1*-Gen nachgewiesen wurden. Einer der beiden Klone, der auch im Urin zu finden war, besaß zusätzlich das Typ-1-Fimbriengencluster, so daß es sich gemäß der dieser Arbeit zugrunde liegenden Definition um unterschiedliche Klone handelt. Auch in der PFGE wies dieser Klon ein anderes Bandenmuster auf (XV).

4.1.5.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

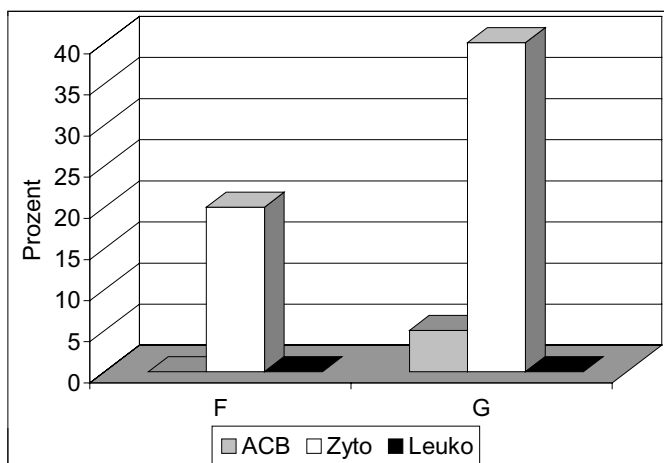


Abb. 16 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin (Pat. Nr. 8)

Am 11.03.98 (Abnahmedatum F) betrug der ACB-Wert 0%, am darauffolgenden Abnahmedatum G (01.10.98) waren lediglich 5% der im Urin gefundenen Bakterien mit Antikörpern beladen.

Obwohl die Patientin keine Infektzeichen aufwies, stieg der Zytoadhärenzwert von 20% auf 40% an.

Zu keinem Abnahmezeitpunkt fanden sich vitale Leukozyten im Urin.

4.1.6 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 11 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 8 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 11 aufgetretenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 8 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr.11

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
19.03.98(B)	11B1-6	-	-	-	+	-	2	II
01.07.98(C)	11C1,2U	-	+	-	+	-	3	III
	11C3,4,6U	-	-	-	-	-	4	IV
	11C5U	-	-	-	-	-	5	V

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfa/foc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)

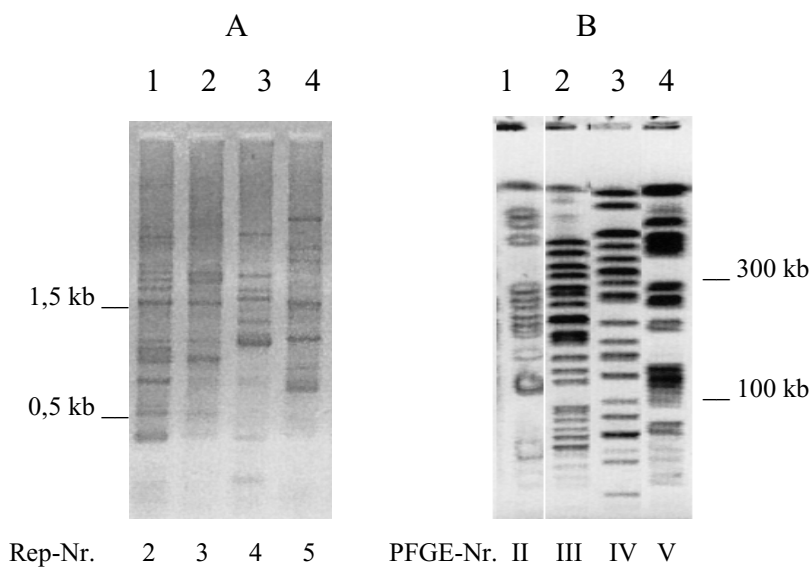


Abb. 17 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolatene der Pat. 11. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (11B1), 2 (11C1U), 3 (11C3U), 4 (11C5U). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 8 ersichtlich.

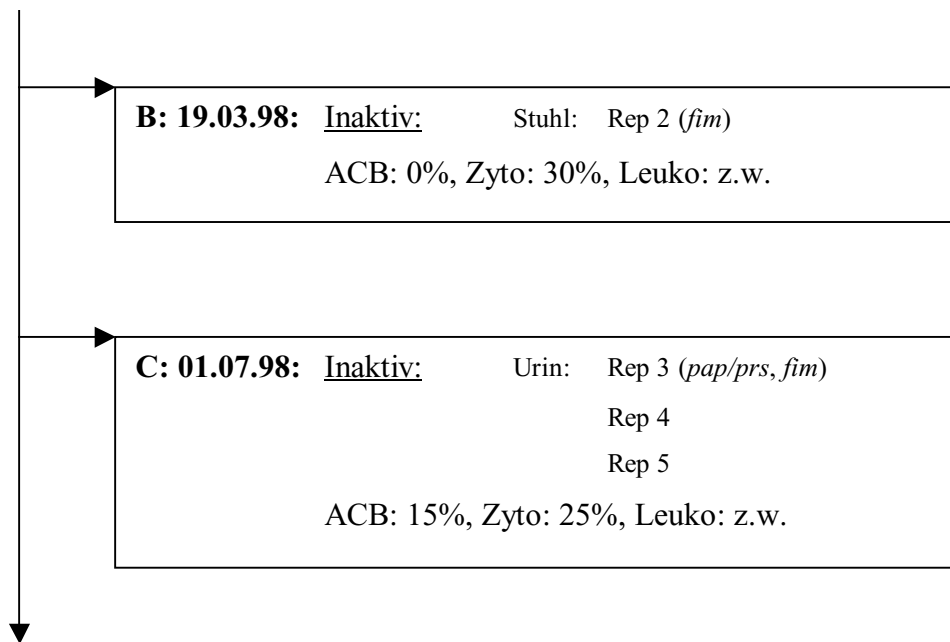


Abb. 18 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 11)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Bei dieser Patientin ließ sich am 19.03.98 (Abnahmedatum B) nur ein Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2 (PFGE-Muster II) aus dem Stuhl isolieren, der das *fim*-Gencluster trug. Am 01.07.98 (Abnahmedatum C) fanden sich drei verschiedene Klone in der Urinprobe: Ein P- und Typ-1-Fimbrien tragender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 3 (PFGE-Muster III) sowie zwei apathogene Klone mit den Bandenmustern Nr. 4 und Nr. 5 in der Rep-PCR (PFGE-Muster IV und V). An beiden Abnahmedaten zeigte die Patientin keinerlei Beschwerden und unauffällige Urinbefunde.

4.1.6.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

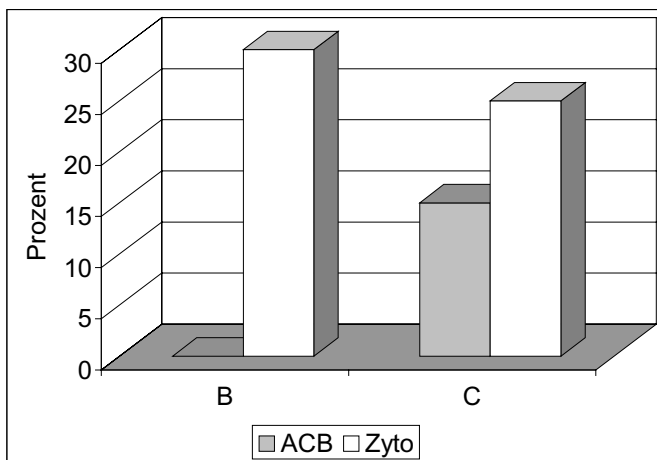


Abb. 19 Antikörperbeladung und Zytoadhärenz (Pat. Nr. 11)

Am 19.03.98 (Abnahmedatum B) betrug die Antikörperbeladung 0% und stieg bis zum 01.07.98 (Abnahmedatum C) auf 15% an.

Obwohl die Patientin zu keinem Abnahmezeitpunkt klinische Auffälligkeiten zeigte, konnte am Abnahmedatum B ein Zytoadhärenzwert von 30% und am Abnahmedatum C ein Zytoadhärenzwert von 25% nachgewiesen werden.

Die Vitalität der Leukozyten konnte an beiden Tagen nicht bestimmt werden, da sich jeweils nicht genügend Zellen im Urin befanden.

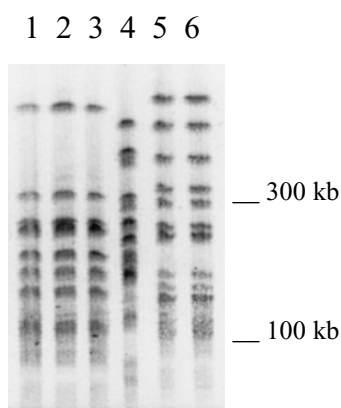
4.1.7 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 16 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 9 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 16 aufgetretenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 9 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr.16

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
04.03.98(B)	16B1,5,6	-	-	-	-	-	1	I
	16B2	-	-	+	+	-	4	IV
	16B3,4	-	-	-	-	-	5	V

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfa/foc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)



PFGE-Nr. I I I IV V V

Abb. 20 Darstellung der PFGE-Muster von Isolaten der Pat. 16.

Die PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen:

1 (16A1), 2 (16B1), 3 (16B6), 4 (16B2), 5 (16B3), 6 (16B4).

Das Virulenzprofil sowie die Nummern der Rep-PCR-Muster der jeweiligen Stämme sind aus Tab. 9 ersichtlich.

Am 04.03.98 (Abnahmedatum B) zeigte sich bei der Patientin Nr. 16 eine asymptomatische Bakteriurie mit dem Nachweis von Proteus- Bakterien im Urin. In der

Stuhlprobe fanden sich drei verschiedene *E. coli*-Klone, von denen der apathogene Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 (PFGE-Muster I) bereits am 27.08.97 (Abnahmedatum A) im Urin und im Stuhl nachgewiesen worden war. Dieser Klon persistierte also über einen Zeitraum von sechs Monaten. Außerdem wurden ein weiterer apathogener Klon mit dem Rep-Muster Nr. 5 (PFGE-Muster V) und ein S- und Typ-1-Fimbrien tragender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 4 (PFGE-Muster IV) isoliert.

4.1.7.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

Die Antikörperbeladung und der Zytoadhärenzwert lagen an diesem Abnahmetag bei 0%.

Der Anteil vitaler Leukozyten konnte nicht bestimmt werden, weil nicht genügend Leukozyten im Urin vorhanden waren.

4.1.8 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 19 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 10 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 19 vorgefundenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 10 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 19

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfafoc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
24.07.98(A)	19A1-3	+	-	+	+	+	1	I
24.07.98(A)	19A4-6	-	-	-	-	-	2	II
27.07.98(B)	19B1-6							
30.07.98(C)	19C1,2							
30.07.98(C)	19C3-6	-	-	-	+	-	3	III

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfafoc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)

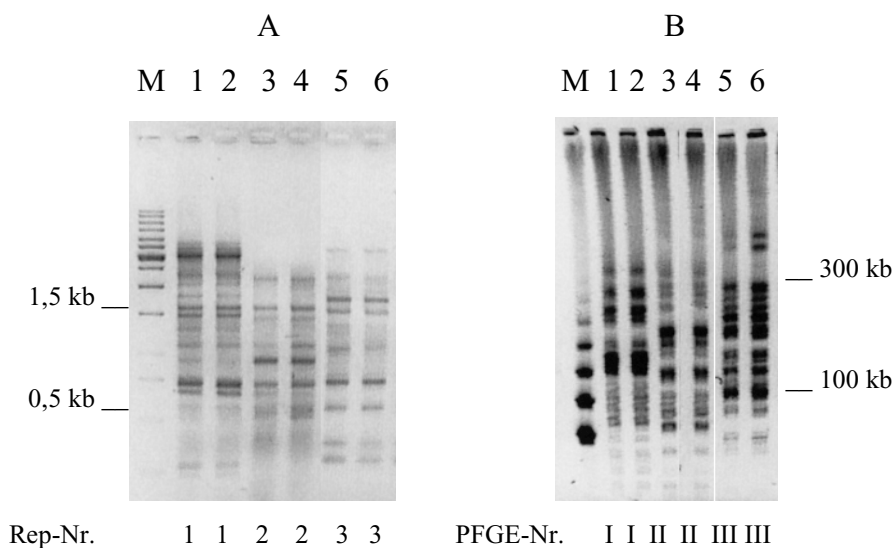


Abb. 21 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolaten der Pat. 19. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (19A1), 2 (19A2), 3 (19A4), 4 (19B1), 5 (19C3), 6 (19C6), M (DNA- bzw. Lambda-Größenmarker). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 10 ersichtlich.

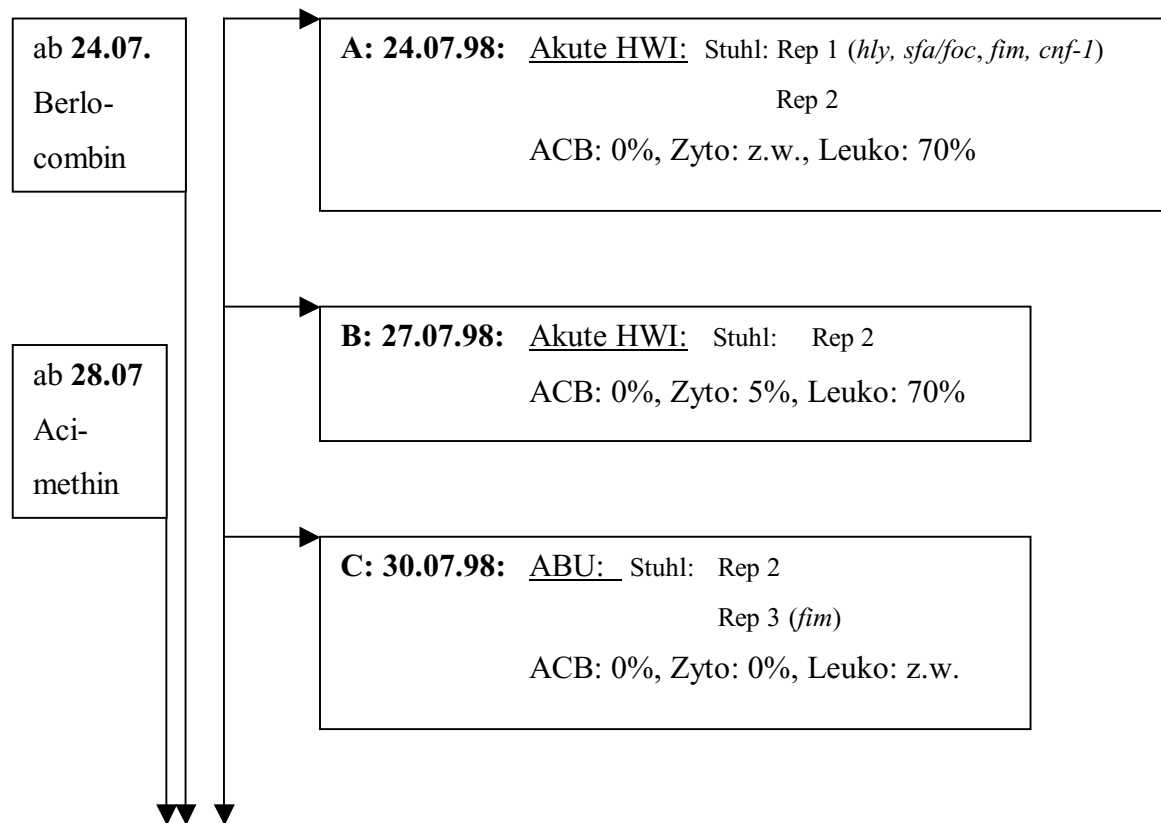


Abb. 22 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 19)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Da die Patientin am 24.07.98 (Abnahmedatum A) unter einem akuten Harnwegsinfekt litt, wurde sie mit dem Antibiotikum Berlocombin® behandelt. In der Stuhlprobe fand sich ein hämolytischer Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1, der zusätzlich die S- und Typ-1-Fimbriengencluster sowie das *cnf-1*-Gen besaß. Außerdem konnte ein völlig apathogener Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2 isoliert werden, der auch an den darauffolgenden Abnahmetagen B (27.07.98) und C (30.07.98) nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zu der Antibiotikatherapie begann die Patientin ab dem 28.07.98 mit einer Acimethin-Langzeitprophylaxe. Am 30.07.98 war die Patientin zwar beschwerdefrei, die Laborkontrolle ergab allerdings immer noch eine signifikante Bakteriurie. Zu diesem Zeitpunkt fand sich außer dem apathogenen Klon noch ein Typ-1-Fimbrien tragender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 3 in der Stuhlprobe. Bei dieser

Patientin zeigten die untersuchten Isolate der drei gefundenen Klone auch jeweils unterschiedliche Bandenmuster in der PFGE, die mit I bis III benannt wurden.

4.1.8.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

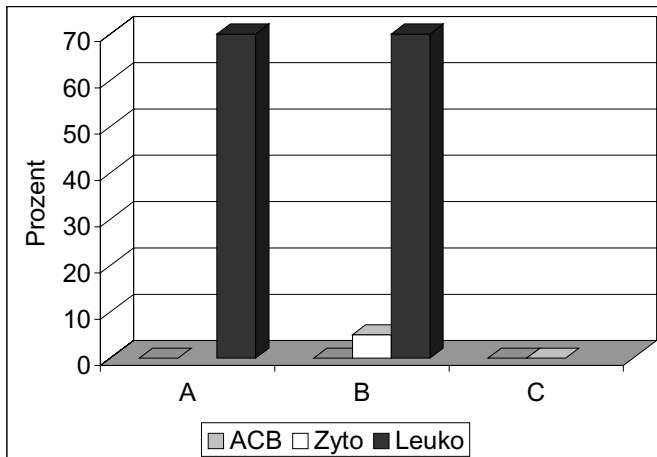


Abb. 23 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin (Pat. Nr. 19)

Obwohl die Patientin an allen Abnahmedaten klinisch auffällig war, waren zu keinem Zeitpunkt die im Urin gefundenen Bakterien mit Antikörpern beladen, der ACB-Wert betrug somit stets 0%.

Der Zytoadhärenzwert konnte am 24.07.98 nicht bestimmt werden, da sich zu wenige Plattenepithelien im Urin befanden, drei Tage später betrug er 5% und wiederum drei Tage später war er auf 0% abgefallen.

70% der Leukozyten im Urin waren an den Abnahmedaten A und B noch vital, am Abnahmedatum C fanden sich schließlich zu wenig dieser Zellen im Urin, um diesen Wert bestimmen zu können.

4.1.9 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 20 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 11 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 20 vorgefundenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 11 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 20

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfafoc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
24.08.98(A)	20A1-6	+	+	+	+	+	1	I
	20A1-6U							
26.08.98(B)	20B1,3-6							
26.08.98(B)	20B2	-	-	-	-	-	2	II
03.09.98(C)	20C1-6	-	-	-	-	-	3	III

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfafoc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)

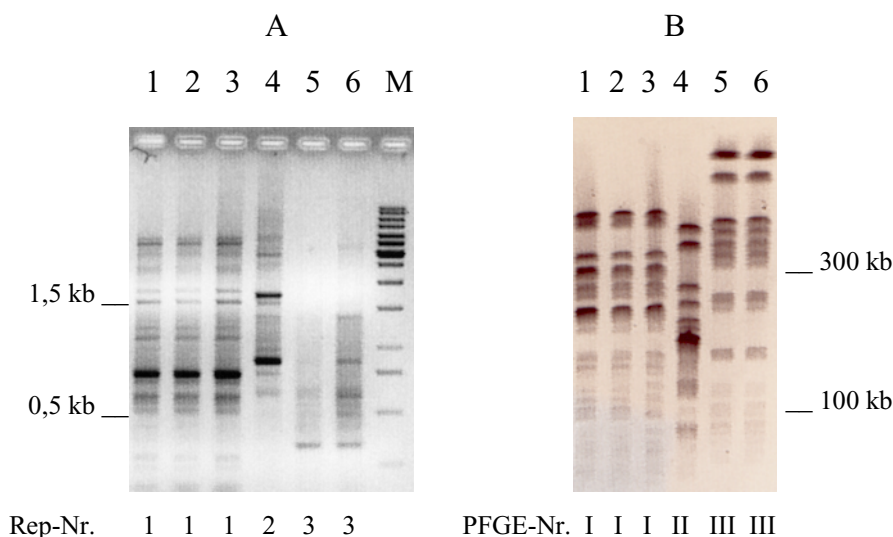


Abb. 24 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolatn der Pat. 20. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (20A1), 2 (20A1U), 3 (20B1), 4 (20B2), 5 (20C1), 6 (20C6), M (DNA-Größenmarker). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 11 ersichtlich.

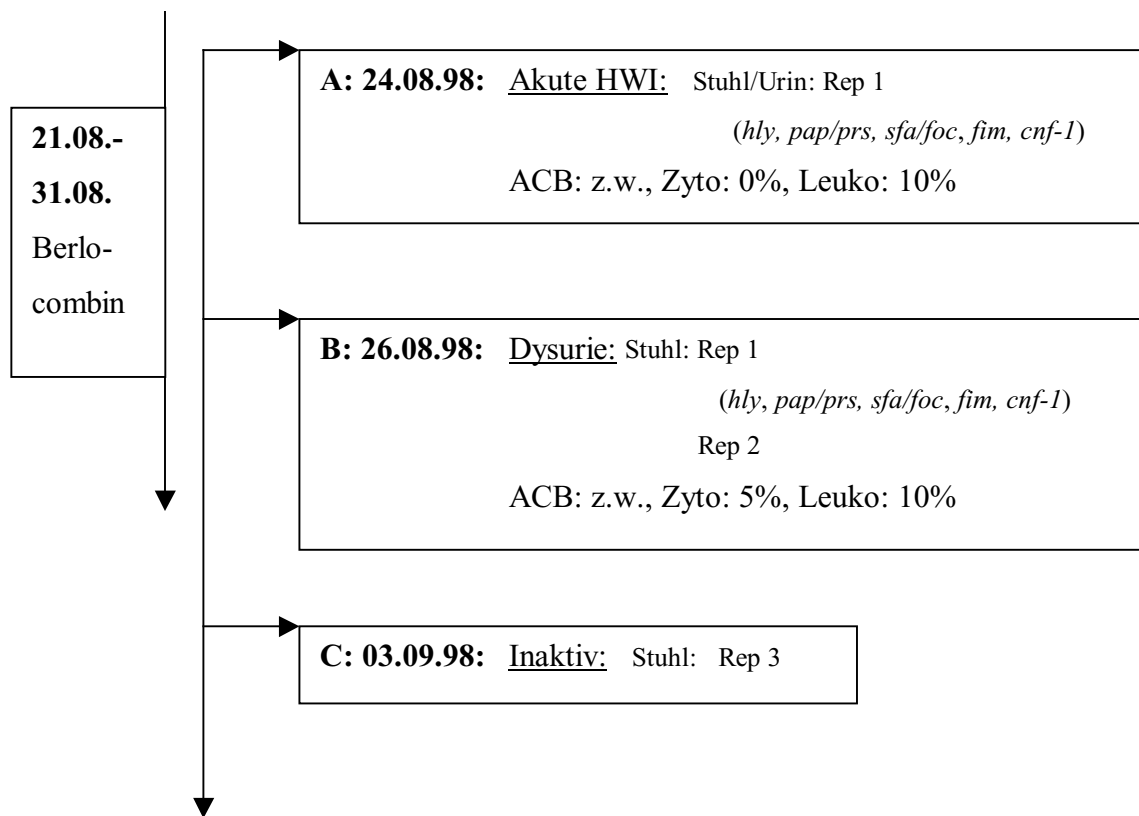


Abb. 25 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 20)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Am 24.08.98 (Abnahmedatum A) konnte sowohl im Stuhl als auch im Urin der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 gefunden werden, der die Pathogenitätsfaktorkombination *hly, pap/prs, sfa/foc, fim* und *cnf-1* trug und in der PFGE das Bandenmuster I zeigte. Zu diesem Zeitpunkt litt die Patientin unter einer akuten Harnwegsinfektion, weswegen sie bereits seit 3 Tagen mit einem Antibiotikum (Berlocobin®) behandelt wurde. Auch zwei Tage später konnte dieser Klon noch im Stuhl gefunden werden, während aus dem Urin keine Isolate mehr gewonnen werden konnten. Betrachtet man die phänotypischen Ergebnisse der einzelnen Stämme, so fällt auf, daß alle Isolate des Abnahmetages A P-, S- und Typ-1-Fimbrien auch tatsächlich produzierten, während zwei Tage später keine S-Fimbrien- sowie eine P- und Typ-1-Fimbrien-Produktion nur noch teilweise

nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich fand sich im Stuhl ein neuer, apathogener Stamm, der in der Rep-PCR das Bandenmuster Nr. 2 zeigte (PFGE-Muster II). Nach Abschluß der antibiotischen Therapie konnte am 03.09.98 (Abnahmedatum C) aus der Stuhlprobe der ebenfalls apathogene Klon mit dem Rep-Muster Nr. 3 (PFGE-Muster III) angezüchtet werden, im Urin wuchsen dagegen keine Isolate an.

4.1.9.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

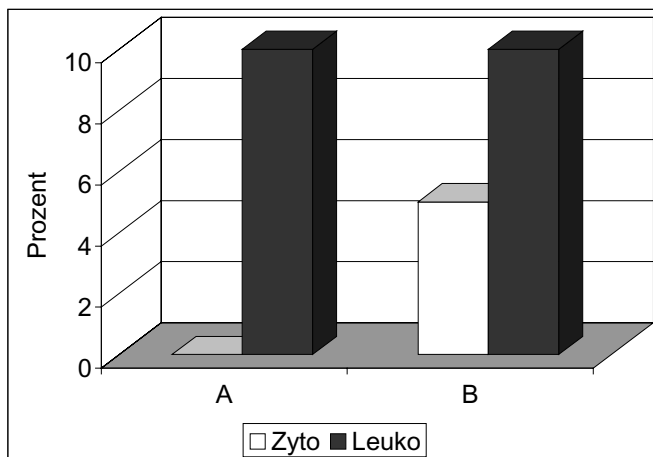


Abb. 26 Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin (Pat. Nr. 20)

An den Abnahmedaten A und B befanden sich zu wenig Bakterien im Urin, um die Antikörperbeladung bestimmen zu können. Dies könnte durch die Tatsache erklärt werden, daß die Patientin schon seit drei Tagen mit dem Antibiotikum Berlocombin® behandelt worden war.

Der Zytoadhärenzwert betrug zunächst 0% und stieg zwei Tage später auf 5% an.

Jeweils 10% der Leukozyten im Urin waren noch vital.

Am Abnahmedatum C wurden die Antikörperbeladung, die Zytoadhärenz und die Vitalität der Leukozyten im Urin nicht bestimmt.

4.1.10 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 21 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 12 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 21 aufgetretenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 12 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 21

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfafoc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
23.09.98(A)	21A1,2,4,6	+	+	-	+	-	1	I
	21A3,5	+	+	+	+	-	2	II
02.10.98(B)	21B1-6	+	-	-	+	-	3	III

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfafoc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)

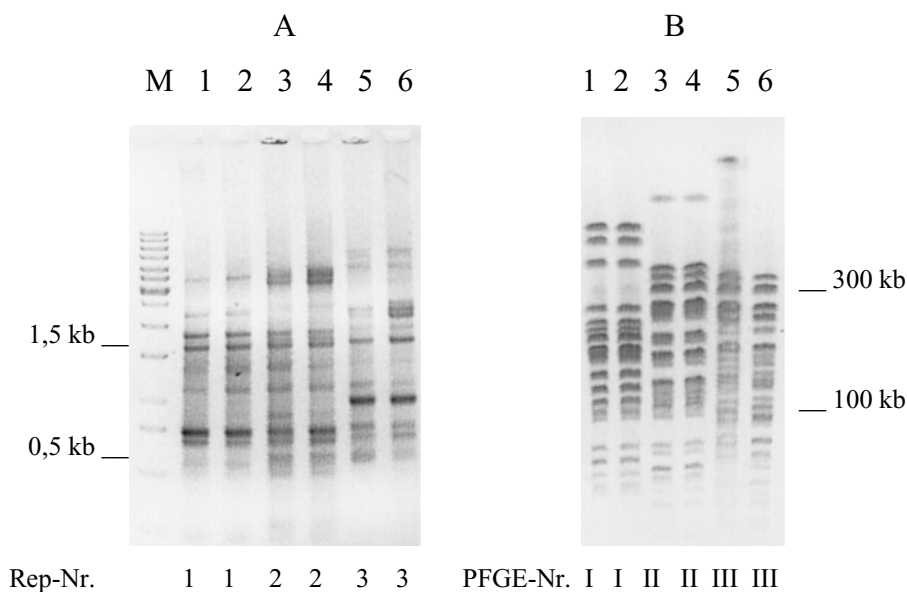


Abb. 27 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolatzen der Pat. 21. Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen: 1 (21A1), 2 (21A6), 3 (21A3), 4 (21A5), 5 (21B1), 6 (21B6), M (DNA-Größenmarker). Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 12 ersichtlich.

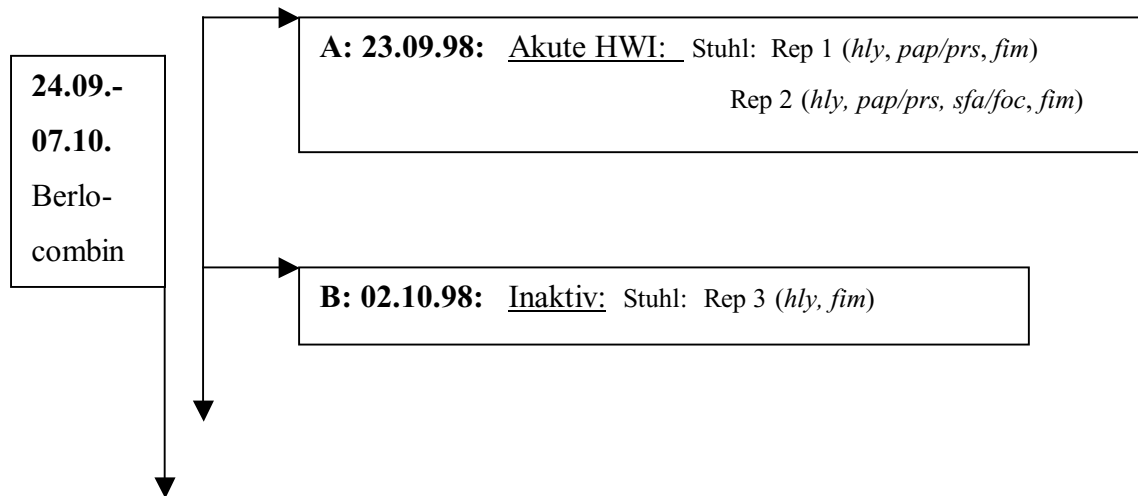


Abb. 28 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 21)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Am 23.09.98 (Abnahmedatum A) wurden zwei hämolytische Klone aus dem Stuhl isoliert. Die Patientin litt zu diesem Zeitpunkt unter einem akuten Harnwegsinfekt. Der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 produzierte zusätzlich P- und Typ-1-Fimbrien, der andere Klon enthielt neben dem α -Hämolysin- auch das P-, S- und Typ-1-Fimbriengencluster und zeigte in der Rep-PCR das Bandenmuster Nr. 2. Ein Tag später wurde mit einer Antibiotikatherapie (Berlocombin®) begonnen. Am Kontrolltermin (02.10.98), an dem die Patientin bereits beschwerdefrei war, konnte ein weiterer Klon mit dem Rep-Muster Nr. 3 aus der Stuhlprobe isoliert werden. Dieser zeigte sich in der PCR für das *hly*- und *fim*-Gencluster positiv. In der PFGE wiesen alle drei Klone die unterschiedlichen Bandenmuster I-III auf.

4.1.10.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

Bei der Patientin Nr. 21 wurde keiner dieser Werte an den Abnahmetagen A und B bestimmt.

4.1.11 Ergebnisse der geno- und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der Isolate von Patientin Nr. 22 und Darstellung des klinischen Verlaufs

In Tab. 13 werden zunächst das Vorkommen der untersuchten Pathogenitätsfaktoren sowie die Rep-PCR- und PFGE-Muster der bei Patientin Nr. 22 vorgefundenen Klone zusammengefaßt.

Tab. 13 Genotypische Ergebnisse und Identitäts-Screening der Pat. Nr. 22

Datum	Stamm-Nr.	<i>hly</i>	<i>pap/prs</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
02.10.98(A)	22A1,3-6	-	-	-	+	-	1	I
02.10.98(A)	22A2	+	+	+	+	+	2	II
07.10.98(B)	22B2,3U							
07.10.98(B)	22B1-6	-	+	-	+	-	3	III
	22B1,4-6U							
21.10.98(C)	22C1	-	-	-	+	-	4	IV
	22C2-6							
	22C1-6U							

Abkürzungen: *hly* (α -Hämolysingencluster), *pap/prs* (P-Fimbriengencluster), *sfa/foc* (S-Fimbriengencluster), *fim* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen), Rep (fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters), PFGE (fortlaufende Nummer des PFGE-Musters)

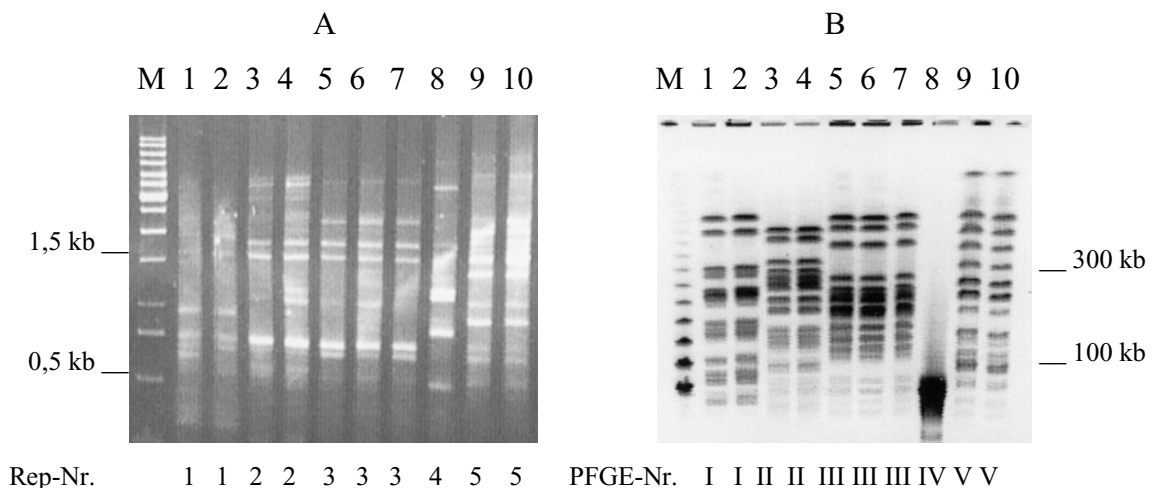


Abb. 29 Darstellung der Rep-PCR-Muster (A) und PFGE-Muster (B) von Isolaten der Pat. 22.

Die PCR-Produkte bzw. PFGE-Muster folgender *E. coli*-Isolate wurden aufgetragen:

1 (22A1), 2 (22A3), 3 (22A2), 4 (22B2U), 5 (22B1), 6 (22B1U), 7 (22B4U), 8 (22C1), 9 (22C2), 10 (22C1U), M (DNA- bzw. Lambda-Größenmarker).

Das Virulenzprofil der jeweiligen Stämme wird aus Tab. 13 ersichtlich.

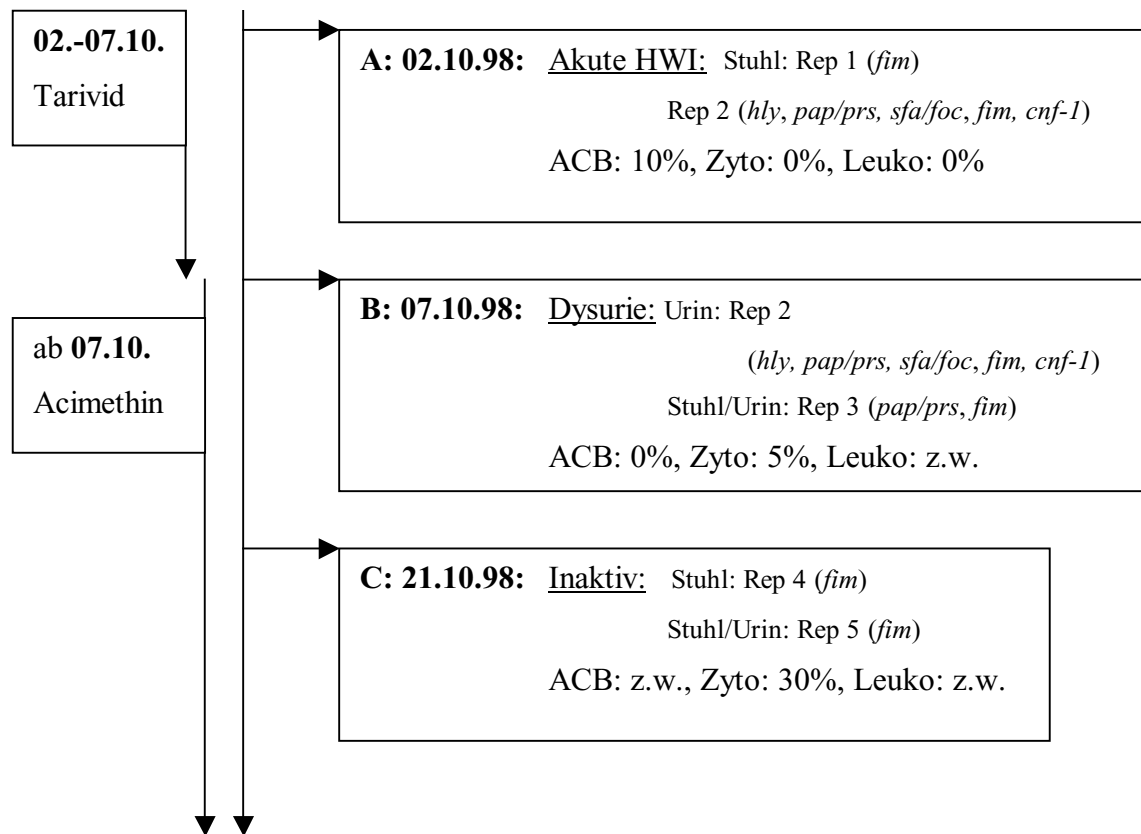


Abb. 30 Chronologische Darstellung des Auftretens der verschiedenen Klone unter Berücksichtigung von Klinik und Therapie (Pat. Nr. 22)

Abkürzungen: ABU (asymptomatische Bakteriurie), ACB (Antikörperbeladung), Zyto (Zytoadhärenz), Leuko (Vitalität der Leukozyten).

Am ersten Abnahmetag A (02.10.98) litt die Patientin unter einer akuten Harnwegsinfektion. Sie wurde deshalb für 5 Tage mit dem Gyrasehemmer Ofloxacin (Tarivid®) behandelt. Im Stuhl fanden sich der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 (PFGE-Muster I), der lediglich positiv für das Typ-1-Fimbriengencluster war, und der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2 (PFGE-Muster II), bei dem in der PCR die Gene der Pathogenitätsfaktoren *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* nachgewiesen werden konnten. Nach 5-tägiger antibiotischer Behandlung und Beschwerdebesserung ließen sich wider Erwarten Urinisolate anzüchten, und zwar interessanterweise der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2 sowie der neue P- und Typ-1-Fimbrien tragende Klon mit dem Rep-Muster Nr. 3 (PFGE-Muster III), der an diesem Tag (07.10.98) auch im Stuhl zu finden war. Zu diesem Zeitpunkt wurde nun eine Acimethin-Dauerprophylaxe

begonnen. Am 21.10.98 (Abnahmedatum C) konnten schließlich nur noch Stuhl- und Urinisolat mit dem *fim*-Gencluster gefunden werden, die in der Rep-PCR die Bandenmuster Nr. 4 (PFGE-Muster IV) und Nr. 5 (PFGE-Muster V) zeigten. Bei dem PFGE-Bandenmuster IV des Isolats 22C1 könnte es sich allerdings auch um das typische Muster eines *Proteus*-Stammes handeln. Die Patientin war mittlerweile beschwerdefrei geworden.

4.1.11.1 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin

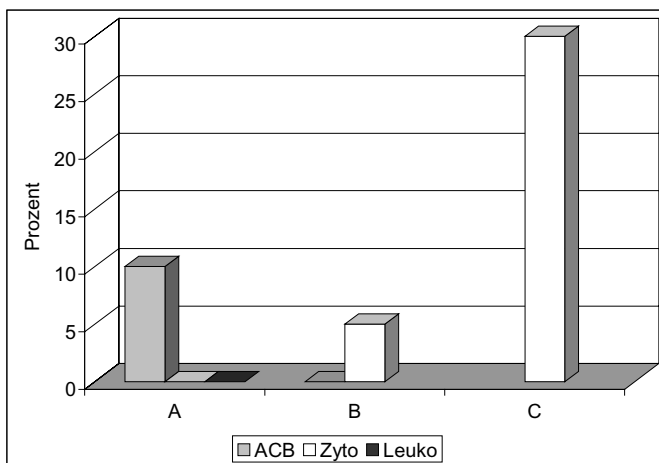


Abb. 31 Antikörperbeladung, Zytoadhärenz und Vitalität der Leukozyten im Urin (Pat. Nr. 22)

Die Antikörperbeladung fiel parallel zum klinischen Verlauf von 10% auf 0% ab, am 21.10.98 fanden sich dann zu wenige Bakterien im Urin, um diesen Wert bestimmen zu können.

Der Zytoadhärenzwert dagegen stieg kontinuierlich von 0% auf 5% und schließlich auf 30% an.

Am Abnahmedatum A konnten keine vitalen Leukozyten im Urin gefunden werden, an den beiden darauffolgenden Abnahmedaten fanden sich zu wenig Leukozyten im Urin, um diesen Wert bestimmen zu können.

4.2 Auftreten von Persistenzen einzelner *E. coli*-Isolate

Bei einigen Patientinnen wurden *E. coli*-Isolate eines Klons an mehreren Abnahmedaten gefunden. Es handelt sich also um Persistenzen bestimmter *E. coli*-Stämme über unterschiedlich lange Zeiträume hinweg. Bei der Untersuchung dieser Frage wurden die Daten von einer vorausgehenden Studie von Frau Brauchle miteinbezogen (Brauchle, 2002).

Bei der Patientin Nr. 1 persistierte der hämolytische Klon mit dem Rep-Muster Nr. 12 (PFGE-Muster XIII) vom 21.01.98 (Abnahmedatum G) bis zum 01.04.98 (Abnahmedatum H). In der PCR konnten außerdem die Gencluster für P-, S- und Typ-1-Fimbrien sowie das zytotoxisch-nekrotisierende Faktor 1-Gen nachgewiesen werden. Am 05.11.97 (Abnahmedatum F) war ebenfalls ein Klon mit dem gleichen Rep- und PFGE-Bandenmuster isoliert worden, dieser besaß aber nicht die Information für die S-Fimbrienproduktion (siehe Tab. 3 sowie Abb. 3).

Der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 15 (PFGE-Muster XIII), der in der PCR positiv für *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* war, persistierte über drei Monate vom April (Abnahmedatum H) bis zum Juli 98 (Abnahmedatum I) (siehe Tab. 3 sowie Abb. 3).

Insgesamt besaßen bei dieser Patientin drei verschiedene Klone das gleiche Bandenmuster in der PFGE. Es handelt sich dabei um die Klone mit den Rep-Mustern Nr. 12, Nr. 15 und Nr. 16, die auch in der Kombination ihrer Pathogenitätsfaktoren identisch waren (siehe Tab. 3 sowie Abb. 3).

Bei der Patientin Nr. 2 wurde ein Klon mit dem Rep-Bandenmuster Nr. 11 sowohl im Januar 98 (Abnahmedatum G) als auch im April (Abnahmedatum H) und im Juli (Abnahmedatum I) des gleichen Jahres jeweils aus dem Urin isoliert (siehe Tab. 4). Dabei war die Patientin im Januar noch asymptomatisch, im April und Juli fand sich dann jedoch eine ABU. Der Klon zeigte sich lediglich für das *fim*-Gencluster positiv. Aus den entsprechenden Stuhlproben konnte dieser Klon nicht angezüchtet werden.

Bei der gleichen Patientin ließen sich Isolate mit dem PFGE-Bandenmuster XI im Juli (Abnahmedatum I) sowie im Oktober 98 (Abnahmedatum K) nachweisen, die Isolate unterscheiden sich allerdings in der Rep-PCR (Bandenmuster Nr. 12, Nr. 13 und Nr. 16) (siehe Tab. 4 sowie Abb. 7). An Pathogenitätsfaktoren konnten das S- sowie das Typ-1-

Fimbriengencluster nachgewiesen werden, wobei im Oktober, als die Patientin über Dysurie klagte, diese Faktoren phänotypisch nicht exprimiert wurden (siehe Tab. 15).

Der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 5 (PFGE-Muster V) bei der Patientin Nr. 3 konnte an neun verschiedenen Abnahmedaten über insgesamt 9 Monate gefunden werden (Juli 97 (Abnahmedatum C), Oktober 97 (Abnahmedaten D und E), November 97 (Abnahmedatum G), Dezember 97 (Abnahmedatum H), Februar 98 (Abnahmedaten K und L), März 98 (Abnahmedatum N) und April 98 (Abnahmedatum O)) (siehe Tab. 5). Dabei konnte er zeitweise aus Stuhl- und Urinproben, teilweise aber auch nur aus einer der beiden Proben isoliert werden. Die Patientin erlitt in diesem Zeitraum dreimal eine Harnwegsinfektion (Juli, Oktober, Februar) und zwischendurch fand sich stets eine ABU, so daß sie sowohl antibiotisch als auch mit Acimethin® behandelt wurde. Bei dem Klon konnte das Gencluster für Typ-1-Fimbrien nachgewiesen werden.

Ebenso persistierte bei dieser Patientin der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 14 (PFGE-Muster XIII) vom 28.1. bis zum 25.2.98 im Stuhl. In der PCR ließen sich keine der in dieser Arbeit untersuchten Pathogenitätsfaktoren nachweisen (siehe Tab. 5).

Bei der Patientin Nr. 5 persistierte der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 6 (PFGE-Muster VII) im Stuhl und der Klon mit dem Rep-Muster Nr.7 (PFGE-Muster VI) im Urin von Dezember 97 (Abnahmedatum B, asymptomatisch) bis März 98 (Abnahmedatum C, ABU). Der Stuhklon zeigte nur das *fim*-Gencluster, während bei dem Urinklon die Gene für *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* nachweisbar waren (siehe Tab. 6).

Über 6 Monate persistierte der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 (PFGE-Muster I) bei der Patientin Nr. 16 (von August 97 (Abnahmedatum A) bis März 98 (Abnahmedatum B)). Er zeigte keine der untersuchten Pathogenitätsfaktoren, am zweiten Abnahmedatum fand sich allerdings eine ABU (siehe Tab. 9 sowie Abb. 20).

Der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2 (PFGE-Muster II) der Patientin Nr. 19, bei dem keine der untersuchten Pathogenitätsfaktoren gefunden werden konnten, ließ sich am 24.7. (Abnahmedatum A), am 27.7. (Abnahmedatum B) und am 30.7.98 (Abnahmedatum C) im Stuhl der Patientin nachweisen. Dabei handelt es sich zwar

lediglich um eine Persistenz von 7 Tagen, in denen die Patientin aber unter einem akuten Harnwegsinfekt litt und daher mit einem Antibiotikum (Berlocombin®) und ab dem 28.7. zusätzlich mit Acimethin® behandelt wurde (siehe Tab. 10).

Bei der Patientin Nr. 20 konnte der Klon mit dem Rep-Muster Nr.1 (PFGE-Muster I) unter Antibiotikatherapie (Berlocombin®) wiederholt gefunden werden (am 24.8. (Abnahmedatum A) sowie am 26.8.98 (Abnahmedatum B)) (siehe Tab.11). Im Gegensatz zur Patientin Nr. 19 zeigte dieser Klon allerdings die Genkombination *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1*. Während am 24.8. diese Faktoren auch allesamt phänotypisch nachgewiesen wurden, produzierte nur ein Teil der Isolate vom 26.8. P- und Typ-1 Fimbrien, eine S-Fimbrienexpression konnte überhaupt nicht mehr gefunden werden (siehe Tab. 22).

Ähnlich der Patientin Nr. 20 ließ sich der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2 (PFGE-Muster II) der Patientin Nr. 22 ebenfalls nach 5-tägiger Antibiotikatherapie (Tarivid®) erneut nachweisen (2.10. (Abnahmedatum A) bis 7.10.98 (Abnahmedatum B)). Auch dieser Klon war für die Gene *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* positiv, die phänotypische Expression änderte sich unter der Therapie jedoch nicht (siehe Tab. 13).

4.3 Häufigkeit der untersuchten Gene und der phänotypischen Expression

4.3.1 Genotypische Eigenschaften

Im Folgenden wird die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Gencluster dargestellt. Dabei wird im Vergleich zwischen Stuhl- und Urinisolaten von den 46 Stuhl- und den 16 Urinklonen ausgegangen. Da acht dieser Klone aber sowohl aus der Stuhl- als auch aus der Urinprobe der gleichen Patientin isoliert werden konnten, existieren insgesamt gesehen nur 54 verschiedene Klone.

Mit Hilfe der PCR wurden die Stämme auf folgende Gencluster getestet:

- hly*:** Die Gene des α -Hämolysingenclusters wurden bei 25,9 % der Klone nachgewiesen.
- pap/prs*:** 27,8 % der Klone besaßen das P-Fimbriengcluster.
- sfa/foc*:** Bei dieser Testung waren 29,6 % der Klone positiv.
- fim*:** Das Typ-1-Fimbriengcluster zeigten 77,8 % der Klone.
- cnf-1*:** Der Nachweis des Gens für den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 gelang bei 16,7 % der Klone.

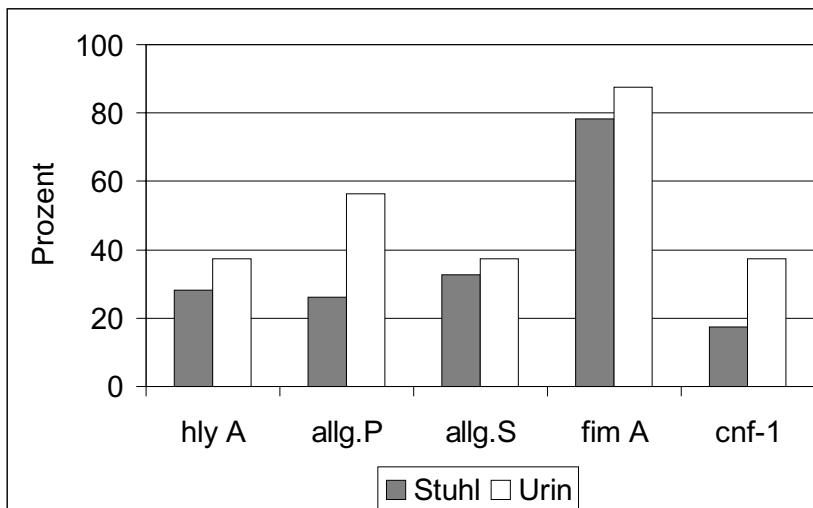


Abb. 32 Vergleich der genotypischen Eigenschaften von Stuhl- und Urinklonen

Abkürzungen: *hlyA* (α -Hämolysingencluster), *allg.P* (P-Fimbriengcluster), *allg.S* (S-Fimbriengcluster), *fimA* (Typ-1-Fimbriengcluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen).

Alle untersuchten Gene fanden sich bei den Urinklonen häufiger als bei den Stuhlklonen. Vor allem die Information für die Produktion von P-Fimbrien und den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 war bei den Urinstämmen mehr als doppelt so häufig vorhanden wie bei den Stuhlisolaten (*pap/prs*: Stuhl: 26,1 %, Urin: 56,3 %; *cnf-1*: Stuhl: 17,4 %, Urin: 37,5 %). Aber auch bei den anderen untersuchten Genclustern zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Stuhl- und Urinklonen: *hly*: Stuhl: 28,3 %, Urin: 37,5 %; *sfa/foc*: Stuhl: 32,6 %, Urin: 37,5 %; *fim*: Stuhl: 78,3 %, Urin: 87,5 %.

4.3.2 Phänotypische Eigenschaften

Da sich einige *E. coli*-Isolate desselben Klons in der phänotypischen Expression unterschieden, wurde bei der Darstellung der phänotypischen Ergebnisse von den gesamten 252 untersuchten Stämmen (166 Stuhl- und 86 Urinisolate) ausgegangen.

Diese wurden auf folgende phänotypische Eigenschaften getestet:

α -Hämolyisin: Einen Hämolysehof auf Blutagarplatten zeigten 26,2 % der Stämme.

P-Fimbrien: Der Nachweis von P-Fimbrien gelang bei 31,0 % der Isolate.

S-Fimbrien: 10,7 % der Isolate agglutinierten mit bovinen Erythrozyten.

Typ-1-Fimbrien: Diese fanden sich bei 53,2 % der Stämme.

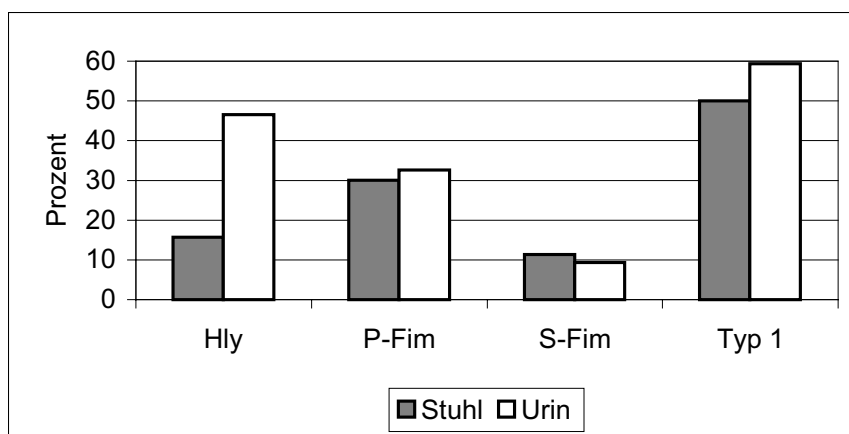


Abb. 33 Vergleich der phänotypischen Eigenschaften von Stuhl- und Urinisolaten

Abkürzungen: Hly (Hämolyse auf Blutagarplatten), P-Fim (P-Fimbrienexpression), S-Fim (S-Fimbrienexpression), Typ 1 (Typ-1-Fimbrienexpression).

Lediglich bei der Produktion von α -Hämolyysin zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Stuhl- (15,7 %) und Urinstämmen (46,5 %). P- und S-Fimbrien wurden annähernd gleich häufig exprimiert (P-Fimbrien: Stuhl: 30,1 %, Urin: 32,6 %; S-Fimbrien: Stuhl: 11,4 %, Urin: 9,3 %). Eine Typ-1-Fimbrien-Produktion fand sich wiederum bei den Urinisolaten etwas häufiger (Stuhl: 50,0 %, Urin: 59,3 %).

4.3.3 Phänotypische Expressionsrate

Hier soll gezeigt werden, wie viele der genotypisch positiv getesteten *E. coli*-Stämme den entsprechenden Virulenzfaktor auch wirklich exprimierten.

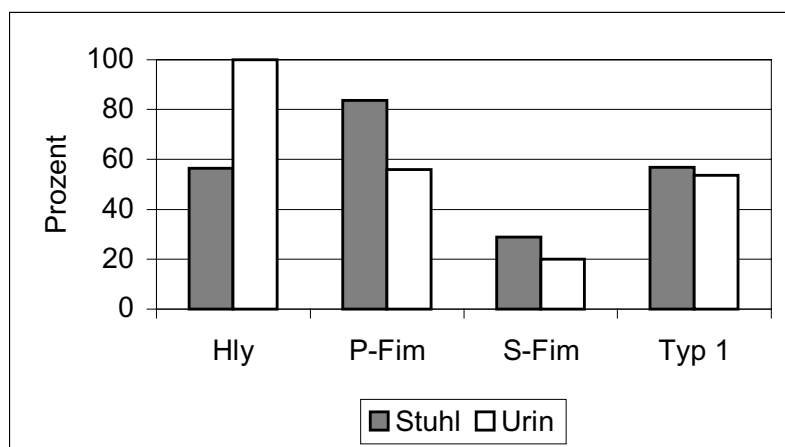


Abb. 34 Vergleich der phänotypischen Expressionsrate von Stuhl- und Urinisolaten

Abkürzungen: Hly (Hämolyse auf Blutagarplatten), P-Fim (P-Fimbrienexpression), S-Fim (S-Fimbrienexpression), Typ 1 (Typ-1-Fimbrienexpression).

Hierbei fällt auf, daß ausschließlich die *hly* positiven Urinstämme das Toxin auch zu 100 % exprimierten, während dies bei den Stuhlstämmen nur zu 56,5 % der Fall war. Eine Fimbrienproduktion fand sich dagegen bei den Stuhlstämmen häufiger, wobei hier der Unterschied bei der P-Fimbrienexpression besonders deutlich war: Stuhl: 83,7 %, Urin: 56,0 %. (S-Fimbrien: Stuhl: 28,9 %, Urin: 20,0 %; Typ-1-Fimbrien: Stuhl: 56,8 %, Urin: 59,3 %).

4.3.4 Phänotypische Besonderheiten

Einige Stämme zeigten sich phänotypisch positiv, obwohl in der PCR die entsprechenden Gencluster nicht nachgewiesen werden konnten. Es handelt sich dabei um folgende Isolate (die in Klammern angegebenen Nummern beziehen sich auf das jeweilige Bandenmuster in der Rep-PCR):

P-Fimbrien:	3K1,3-5 (15)
	11B1-6 (2)
	19C3-6 (3)
S-Fimbrien:	20C1-6 (3)
Typ 1-Fimbrien:	3I2,6 und 3M3,5 (14)
	16B1,5,6 (1)
	16B3,4 (5)
	20C1-6 (3)

4.3.5 Genkombinationen

Bei den 46 Stuhl- und 16 Urinklonen konnten folgende Genkombinationen von Pathogenitätsfaktoren gefunden werden.

Stuhl:	apathogen:	19,6 %	
	1 Faktor:	37,0 %	⇒ <i>fim</i>
	2 Faktoren:	17,4 %	⇒ <i>hly + fim</i> 2,2 % ⇒ <i>pap/prs + fim</i> 6,5 % ⇒ <i>sfa/foc + fim</i> 8,7 %
	3 Faktoren:	6,5 %	⇒ <i>hly + pap/prs + fim</i> 2,2 % ⇒ <i>hly + sfa/foc + fim</i> 4,3 %

	4 Faktoren:	6,5 %	⇒ <i>hly</i> + <i>pap/prs</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> 2,2 %
			⇒ <i>hly</i> + <i>pap/prs</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>cnf-1</i> 2,2 %
			⇒ <i>hly</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>cnf-1</i> 2,2 %
	5 Faktoren:	13,0 %	⇒ <i>hly</i> + <i>pap/prs</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>cnf-1</i>
Urin:	apathogen:	12,5 %	
	1 Faktor:	31,3 %	⇒ <i>fim</i>
	2 Faktoren:	18,8 %	⇒ <i>pap/prs</i> + <i>fim</i>
	5 Faktoren:	37,5 %	⇒ <i>hly</i> + <i>pap/prs</i> + <i>sfa/foc</i> + <i>fim</i> + <i>cnf-1</i>

19,6 % der Stuhl- und 12,5 % der Urinklone waren apathogen, d.h. es konnte keines der getesteten Gencluster nachgewiesen werden.

Lediglich das *fim*-Gencluster zeigten 37,0 % der Stuhl- und 31,1 % der Urinklone, bei den Stuhklonen war diese Gruppe damit die häufigste.

Bei den Urinklonen war jedoch die Kombination aller fünf getesteten Faktoren mit 37,5 % am häufigsten zu finden, welche bei den Stuhklonen wiederum nur zu 13,0 % vorhanden war.

Die Kombination aus zwei Faktoren kam jeweils annähernd gleich häufig vor (Stuhl: 17,4 %, Urin: 18,8 %). Während im Urin aber nur *pap/prs* und *fim* zusammen auftraten, konnten aus den Stuhlproben auch noch die Kombinationen *hly* und *fim* sowie *sfa/foc* und *fim* isoliert werden.

Drei bzw. vier Virulenzfaktoren in Kombination kamen bei den Urinklonen nicht vor, bei den Stuhklonen zeigte sich dieser Fall in jeweils 6,5 % der Fälle.

4.4 Verteilung der Gene und Expressionsraten auf verschiedene klinische Aktivitätsstufen

Im folgenden Kapitel wird dargestellt, ob die Häufigkeit der Gencluster und ihrer Kombinationen sowie die phänotypische Expressionsrate in Zusammenhang mit der klinischen Aktivität stehen. Dazu wurden alle in dieser Arbeit untersuchten *E. coli*-Isolate einer klinischen Aktivitätsstufe zugeordnet.

Klinische Aktivitätsstufen:

1. inaktiv

Die Keimzahlen liegen unter 10^5 /ml Urin und die Patientin hat keine Beschwerden.

2. ABU (asymptomatische Bakteriurie)

Die Keimzahlen sind 10^5 /ml Urin, es liegt also per definitionem eine signifikante Bakteriurie vor. Trotzdem hat die Patientin keine Beschwerden.

3. aktiv

Die Keimzahlen betragen ebenfalls mindestens 10^5 /ml Urin, aber die Patientin zeigt nun klinische Symptome wie Dys- und Algurie, leidet also unter einer akuten Harnwegsinfektion (HWI).

4.4.1 Häufigkeit der untersuchten Gene und Expressionsraten bei den Stuhlklonen in verschiedenen klinischen Aktivitätsstufen

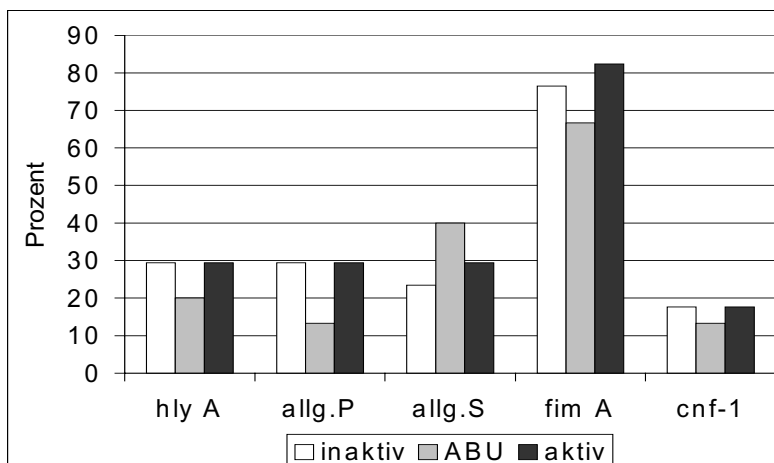


Abb. 35 Genotypische Eigenschaften der Stuhlklone hinsichtlich der verschiedenen klinischen Aktivitätsstufen

Abkürzungen: *hlyA* (α -Hämolysingencluster), *allg.P* (P-Fimbriengencluster), *allg.S* (S-Fimbriengencluster), *fimA* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen).

Das Hämolysin- und P-Fimbriengencluster sowie das *cnf-1*-Gen fanden sich bei den inaktiven Klonen jeweils genauso häufig wie bei den aktiven Stämmen (*hly*: 29,4 %, *pap/prs*: 29,4 %; *cnf-1*: 17,6 %). Die Klone, die in der Zeit einer ABU isoliert wurden, besaßen seltener die entsprechenden Gene (*hly*: 20,0 %; *pap/prs*: 13,3 %; *cnf-1*: 13,3 %). Dafür zeigten diese am häufigsten das S-Fimbriengencluster mit 40,0 %, gefolgt von den aktiven (29,4 %) und schließlich den inaktiven Klonen (23,5 %). Die meisten Klone mit dem Typ-1-Fimbriengencluster ließen sich in der aktiven Phase isolieren (82,4 %), in der inaktiven Phase besaßen 76,5 % und bei den Klonen der ABU 66,0 % das *fim*-Gencluster.

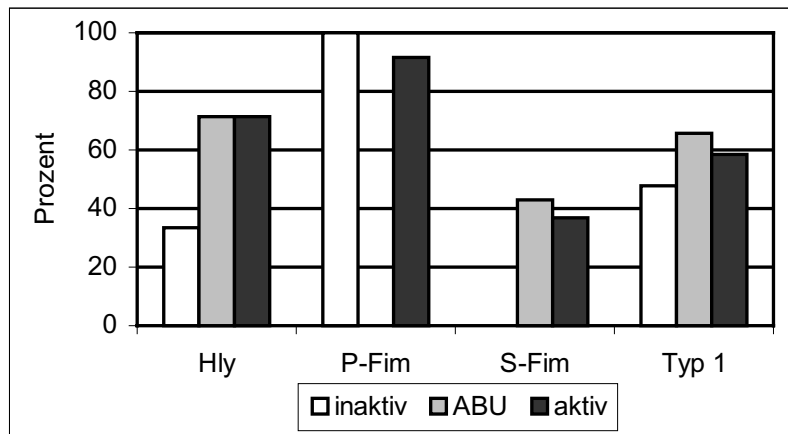


Abb. 36 Phänotypische Expressionsrate der Stuhlstämmen hinsichtlich der verschiedenen, klinischen Aktivitätsstufen

Abkürzungen: Hly (Hämolyse auf Blutagarplatten), P-Fim (P-Fimbrienexpression), S-Fim (S-Fimbrienexpression), Typ 1 (Typ-1-Fimbrienexpression).

Eine Hämolysinproduktion zeigte sich im inaktiven Intervall nur bei 33,3 % der Stämme, während Isolate der ABU und der aktiven Phase das Toxin zu je 71,4 % exprimierten. Ein positiver P-Fimbrien-Nachweis gelang in der inaktiven Phase bei 100 %, in der aktiven Phase bei 91,7 % der genotypisch positiven Stuhlstämmen. 42,9 % der ABU-Isolate und 36,8 % der aktiven Stämme produzierten S-Fimbrien. Bei den genotypisch positiven *E. coli*-Stämmen der ABU konnten keine P-Fimbrien, bei den Stämmen der inaktiven Phase keine S-Fimbrien gefunden werden. Die Expressionsrate der Typ 1-Fimbrien variierte verhältnismäßig wenig bei den unterschiedlichen Aktivitätsstufen. In der inaktiven Phase produzierten 47,7 %, in der aktiven Phase 58,5 % und während einer ABU 65,7 % der genotypisch positiven Stämme dieses Fimbrien-Adhäsins.

4.4.2 Häufigkeit der untersuchten Gene und Expressionsraten bei den Urinklonen in verschiedenen klinischen Aktivitätsstufen

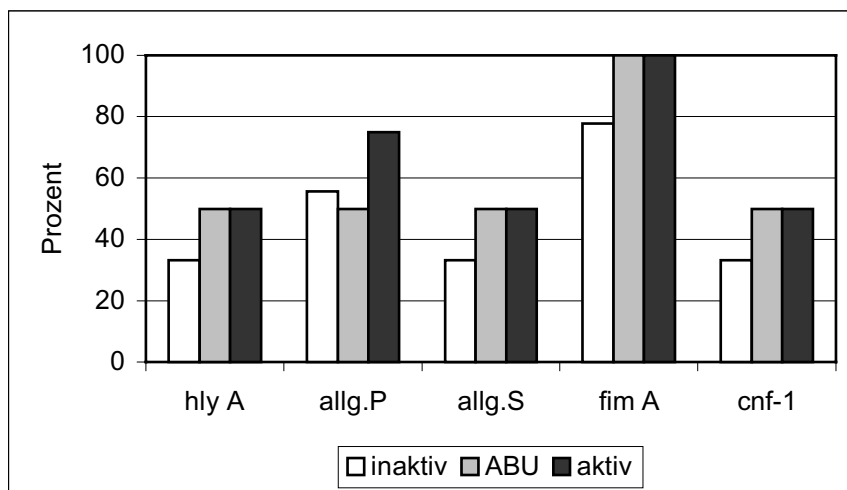


Abb. 37 Genotypische Eigenschaften der Urinklone hinsichtlich der verschiedenen klinischen Aktivitätsstufen

Abkürzungen: *hlyA* (α -Hämolysingencluster), *allg.P* (P-Fimbriengencluster), *allg.S* (S-Fimbriengencluster), *fimA* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen).

Außer dem P-Fimbriengencluster konnten alle Gene zu Zeiten einer ABU bzw. aktiven Phase häufiger gefunden werden als in der inaktiven Zeit. Jeweils 50 % der Klone aus einer ABU oder aktiven Phase trugen die Gene für α -Hämolysin, S-Fimbrien und den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1, in der inaktiven Phase fanden sich diese Gene in je 33,3 % der Fälle. Sämtliche Klone, die in Zeiten der ABU und aktiven Zeit isoliert wurden, besaßen das Gencluster für die Typ 1-Fimbrien-Produktion, bei den inaktiven Klonen waren es immerhin 77,8 %. 50 % der Klone einer ABU, 55,6 % der inaktiven und 75,0 % der aktiven Klone trugen das P-Fimbriengencluster.

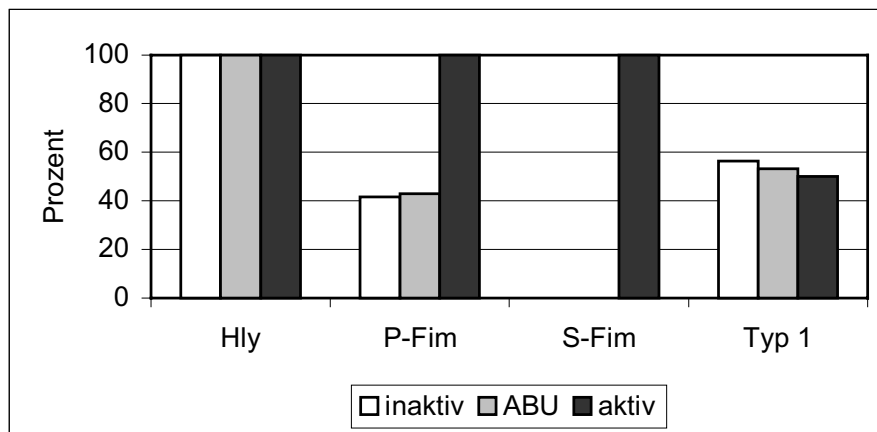


Abb. 38 Phänotypische Expressionsrate der Urinstämme hinsichtlich der verschiedenen, klinischen Aktivitätsstufen

Abkürzungen: Hly (Hämolyse auf Blutagarplatten), P-Fim (P-Fimbrienexpression), S-Fim (S-Fimbrienexpression), Typ 1 (Typ-1-Fimbrienexpression).

Unabhängig von der klinischen Aktivität produzierten alle für das α -Hämolysingencluster positiven Urinstämme dieses Toxin auch. Die Expressionsrate von P-Fimbrien dagegen stieg mit zunehmender Aktivitätsstufe von 41,7 % in der inaktiven über 42,9 % bis zu 100 % in der aktiven Phase an. S-Fimbrien konnten sogar nur bei den aktiven Stämmen nachgewiesen werden (100 %). Bei der Produktion von Typ 1-Fimbrien zeigten sich kaum Unterschiede. In der inaktiven Phase wurden sie zu 56,3 %, in Zeiten der ABU zu 53,1 % und in der aktiven Phase zu 50 % nachgewiesen.

4.4.3 Genkombinationen bei Stuhl- und Urinklonen

Inaktive Phase:

Stuhlklone:	apathogen:	17,6 %	
	1 Faktor:	41,2 %	⇒ <i>fim</i>
	2 Faktoren:	17,6 %	⇒ <i>hly + fim</i> 5,9 % ⇒ <i>pap/prs + fim</i> 11,8 %
	3 Faktoren:	5,9 %	⇒ <i>hly + sfa/foc + fim</i>
	4 Faktoren:	5,9 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + cnf-1</i>
	5 Faktoren:	11,8 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + fim + cnf-1</i>

Urinklone:	apathogen:	22,2 %	
	1 Faktor:	22,2 %	⇒ <i>fim</i>
	2 Faktoren:	22,2 %	⇒ <i>pap/prs + fim</i>
	5 Faktoren:	33,3 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + fim + cnf-1</i>

Asymptomatische Bakteriurie:

Stuhlklone:	apathogen:	33,3 %	
	1 Faktor:	26,7 %	⇒ <i>fim</i>
	2 Faktoren:	20,0 %	⇒ <i>sfa/foc + fim</i>
	3 Faktoren:	6,7 %	⇒ <i>hly + sfa/foc + fim</i>
	5 Faktoren:	13,3 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + fim + cnf-1</i>
Urinklone:	1 Faktor:	50,0 %	⇒ <i>fim</i>
	5 Faktoren:	50,0 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + fim + cnf-1</i>

Aktive Phase:

Stuhlklone:	apathogen:	17,6 %	
	1 Faktor:	41,2 %	⇒ <i>fim</i>
	2 Faktoren:	11,8 %	⇒ <i>pap/prs + fim</i> 5,9 % ⇒ <i>sfa/foc + fim</i> 5,9 %
	3 Faktoren:	5,9 %	⇒ <i>hly + pap/prs + fim</i>
	4 Faktoren:	11,8 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + fim</i> 5,9 % ⇒ <i>hly + sfa/foc + fim + cnf-1</i> 5,9 %
	5 Faktoren:	11,8 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + fim + cnf-1</i>
Urinklone:	1 Faktor:	25,0 %	⇒ <i>fim</i>
	2 Faktoren:	25,0 %	⇒ <i>pap/prs + fim</i>
	5 Faktoren:	50,0 %	⇒ <i>hly + pap/prs + sfa/foc + fim + cnf-1</i>

Bei den Stuhlklonen lassen sich nur schwer Zusammenhänge zwischen der klinischen Aktivität und den gefundenen Genkombinationen erkennen. Vergleicht man direkt die Klone der inaktiven mit denen der aktiven Phase, so findet man eine ähnliche Verteilung der Kombinationen sowohl bezüglich der Häufigkeitsverteilung als auch der

Zusammensetzung an Pathogenitätsfaktoren. Immerhin 33,3 % der Klone aus Zeiten der ABU waren apathogen, die Kombination aller fünf untersuchten Gene fand sich aber mit 13,3 % doch auch relativ häufig.

Apathogene Urklone fanden sich nur in der inaktiven Phase (22,2 %), alle anderen besaßen zumindest das Typ-1-Fimbriengencluster. Die Kombination *hly* + *pap/prs* + *sfa/foc* + *fim* + *cnf-1* trugen 33,3 % der inaktiven Klone, in den höheren Aktivitätsstufen waren es jeweils 50 %. In der inaktiven und der aktiven Phase ließen sich Klone mit den zwei Pathogenitätsfaktoren *pap/prs* und *fim* (22,2 % und 25 %) isolieren, weitere Kombinationen konnten bei den Urklonen nicht nachgewiesen werden.

4.5 Einfluß medikamentöser Therapien

4.5.1 Antibiotische Therapie

Einige Patientinnen wurden in dem Beobachtungszeitraum mit dem Antibiotikum Berlocombin® behandelt. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus dem Folsäurereduktasehemmer Trimethoprim und dem Sulfonamid Sulfamerazin, die häufig bei Harnwegsinfektionen eingesetzt wird.

Die Patientin Nr. 3 erhielt diesen Wirkstoff aufgrund eines akuten Infektes ab dem 05.02.98. Nach 20-tägiger Behandlung wurde das Antibiotikum als niedrig dosierte Langzeittherapie weiter über sechs Monate hinweg eingenommen (siehe Abb. 11). Trotz Therapie persistierten bei dieser Patientin zwei Klone. Der apathogene Klon mit dem Rep-Muster Nr. 14 wurde sowohl am 28.01.98 (Abnahmedatum I), also noch vor Therapiebeginn, als auch am 25.02.98 (Abnahmedatum M) im Stuhl nachgewiesen (siehe Tab. 5).

Der Typ-1-Fimbrien tragende Klon mit dem Rep-Muster Nr. 5 konnte an den Abnahmedaten K (04.02.98), L (12.02.98), N (11.03.98) und O (22.04.98) jeweils aus der Stuhlprobe und am 22.04.98 zusätzlich aus dem Urin angezüchtet werden. Interessanterweise änderte sich bei diesem Klon die phänotypische Expression. Während die Isolate der früheren Abnahmedaten das Typ-1-Fimbrien-Adhäsion nicht produzierten, konnte dieses phänotypisch bei den Isolaten 3N5,6 und 3O2 nachgewiesen werden (siehe Tab. 16).

Wegen einer akuten Harnwegsinfektion wurde die Patientin Nr. 19 ab dem 24.07.98 mit Berlocombin® behandelt. Der *hly*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* positive Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1, der an diesem Tag aus dem Stuhl isoliert wurde, konnte an den darauffolgenden Abnahmedaten nicht mehr nachgewiesen werden.

Der apathogene Klon mit dem Rep-Muster Nr 2, der ebenfalls am 24.07.98 isoliert wurde, fand sich jedoch auch am 27.07.98 und am 30.07.98 in der Stuhlprobe (siehe Tab. 10).

Auch die Patientin Nr. 20 litt unter einem akuten Infekt, so daß sie vom 21.08.98 bis zum 31.08.98 mit Berlocombin® behandelt wurde. Der Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 vom 24.08.98 (Abnahmedatum A), der sich in der PCR positiv für *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* zeigte, und erstaunlicherweise nicht nur aus dem Stuhl, sondern auch aus dem Urin angezüchtet werden konnte, war im Stuhl auch noch zwei Tage später nachweisbar (siehe Tab. 11). Einige der Isolate vom zweiten Abnahmetag B exprimierten jedoch keine P-, S- und Typ-1-Fimbrien mehr, während zu Beginn alle Fimbrien-Adhäsine auch phänotypisch nachweisbar waren (siehe Tab. 22). Nach Therapieende konnte am 03.09.98 (Abnahmedatum C) nur noch ein völlig apathogener Stuhklon mit dem Rep-Muster Nr. 3 isoliert werden.

Die Patientin Nr. 21 erhielt vom 24.09.98 bis zum 07.10.98 Berlocombin®. Der *hly*, *pap/prs* und *fim* positive Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 sowie der *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc* und *fim* positive Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2, die am 23.09.98 (Abnahmedatum A) aus der Stuhlprobe angezüchtet wurden, konnten am 02.10.98 (Abnahmedatum B) nicht mehr nachgewiesen werden. Dafür fand sich an diesem Tag ein Stuhklon mit dem Rep-Muster Nr. 3, der zwar die Hämolysin- und *fim*-Gencluster besaß, diese Pathogenitätsfaktoren aber nicht produzierte (siehe Tab. 12).

Die Patientin Nr. 22 wurde vom 02.10.98 bis zum 07.10.98 mit dem Antibiotikum Tarivid® behandelt, da sie unter einem akuten Harnwegsinfekt litt. Dabei handelt es sich um den Gyrasehemmer Ofloxacin.

Zu Beginn (Abnahmedatum A) wurden ein Typ-1-Fimbrien tragender Klon mit dem Rep-Muster Nr. 1 sowie ein Klon mit dem Rep-Muster Nr. 2, der sich für alle in der PCR untersuchten Pathogenitätsfaktoren positiv zeigte, aus dem Stuhl isoliert. Der zweite Klon war nach Therapieende am 07.10.98 (Abnahmedatum B) im Urin erneut nachweisbar, im Stuhl jedoch nicht mehr. Dort fand sich, wie auch im Urin, ein *pap/prs* und *fim* positiver Klon mit dem Rep-Muster Nr. 3 (siehe Tab. 13).

4.5.2 Acimethin-Langzeitmetaphylaxe

Die Patientinnen Nr. 3, 8, 19 und 22 wurden mit Acimethin® behandelt. Dabei handelt es sich um die Aminosäure L-Methionin, die zur Ansäuerung des Urins oral gegeben wird. Somit soll eine Rezidivprophylaxe bei Patienten mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen erreicht und die Bildung von Struvitsteinen verhindert werden (Oßwald, 1997).

Insgesamt wurden 19 Stuhl- und drei Urinklone unter dieser Therapie bei den vier Patientinnen isoliert.

Zwei der Urinklone trugen nur das *fim*-Gencluster. Es handelt sich um den Klon mit dem Rep-Muster Nr. 5 der Patientin Nr. 3 (siehe Tab. 5) und den Klon mit dem Rep-Muster Nr. 5 der Patientin Nr. 22 (siehe Tab. 13). Der dritte Urinklon fand sich bei der Patientin Nr. 8 und trägt das Rep-Muster Nr. 18. Dieser zeigte sich jedoch für *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* positiv (siehe Tab. 7).

Die Abbildung 39 zeigt die Häufigkeiten der untersuchten Gene bei den 19 unter Acimethin® isolierten Stuhklonen im Vergleich zu den Klonen ohne diese Therapie.

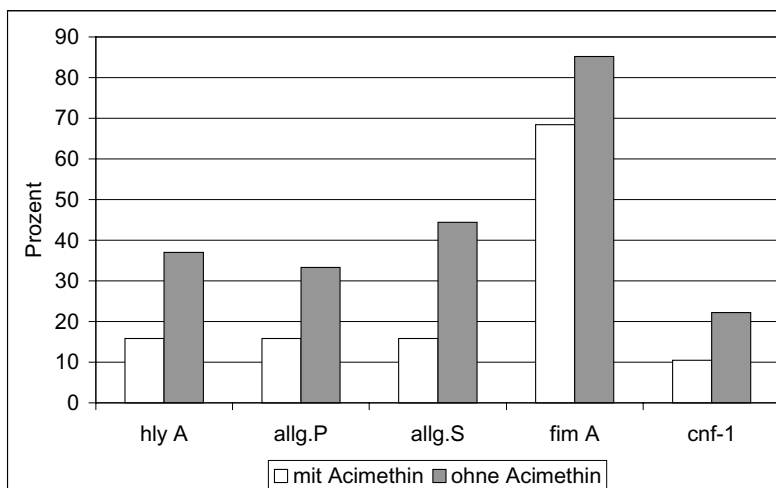


Abb. 39 Genotypische Eigenschaften der Stuhklone mit und ohne Acimethin®

Abkürzungen: *hlyA* (α -Hämolysingencluster), *allg.P* (P-Fimbriengencluster), *allg.S* (S-Fimbriengencluster), *fimA* (Typ-1-Fimbriengencluster), *cnf-1* (Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen).

Alle untersuchten Gene fanden sich bei den Klonen ohne Acimethin® deutlich häufiger als bei denen, die unter dieser Therapie isoliert worden waren.

Das Hämolysin-, P- und S-Fimbriengencluster konnte bei den Klonen mit Acimethin® in jeweils 15,8 % der Fälle nachgewiesen werden, ohne Therapie waren es 37 %, 33,3 % bzw. 44,4 %. 68,4 % der Klone mit Acimethin® besaßen das *fim*-Gencluster, in der Gruppe ohne Acimethintherapie waren es mit 85,4 % deutlich mehr. Das Gen für den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 trugen 10,5 % der Klone mit und 22,5 % der Klone ohne Acimethintherapie.

Betrachtet man die Verteilung der Genkombinationen bei den Stuhlklonen unter Acimethin-Langzeitmetaphylaxe, so trugen 52,6 % lediglich das Typ-1-Fimbriengencluster und 26,3 % waren völlig apathogen. Insgesamt 78,9 % der Klone besaßen also keinen oder nur einen Pathogenitätsfaktor.

In der Gruppe ohne Acimethin® waren lediglich 14,8 % der Klone apathogen, allein das *fim*-Gencluster trugen 25,9 %, so daß hier 40,7 % der Stuhklone maximal einen Virulenzfaktor aufwiesen.

Außerdem konnten bei den Klonen unter Acimethin® vier weitere Genkombinationen gefunden werden. Je ein Klon trug die Kombination *pap/prs + fim*, *hly + sfa/foc + fim* und *hly + pap/prs + sfa/foc + cnf-1* sowie ein Klon mit allen fünf der untersuchten Pathogenitätsfaktoren (je 5,3 %).

5 Diskussion

Zu den häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen gehören Infektionen der Niere und der ableitenden Harnwege, die neben grampositiven und gramnegativen Bakterien auch durch Pilze ausgelöst werden können. In den meisten Fällen findet sich jedoch *Escherichia coli* als Erreger (Warren, 1996). Diese Bakterien machen als harmlose Kommensalen des Kolons weniger als 1 % der Darmflora aus. Uropathogene *E. coli*-Stämme (UPEC) dagegen besitzen spezifische Pathogenitätsfaktoren, die die Mikroorganismen befähigen, sich gegenüber den wirtsspezifischen Abwehrmechanismen durchzusetzen und im Harntrakt zu persistieren oder akute Infektionen auszulösen.

In dieser Studie wurden 252 *E. coli*-Isolate von 11 Patientinnen, die unter chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden, aus Stuhl- und Urinproben gewonnen und auf für uropathogene *E. coli*-Stämme typische Virulenzmerkmale untersucht. Die Stämme wurden hinsichtlich des Vorkommens der Pathogenitätsfaktoren α -Hämolysin, P-, S- und Typ-1-Fimbrien sowie des zytotoxisch-nekrotisierenden Faktors 1 getestet. Konnte keiner der erwähnten Faktoren nachgewiesen werden, wird in dieser Arbeit von apathogenen Isolaten gesprochen. Darüber hinaus wird versucht, nähere Aussagen zur Persistenz und Genomstruktur der Stämme mittels der „Repetitive extragenic palindromic elements“ (Rep)-PCR und der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zu machen.

5.1 Häufigkeit der untersuchten Gencluster

Alle untersuchten Virulenzfaktoren fanden sich bei den aus Urin isolierten Klonen häufiger als bei den Stuhlklonen, was ihre Bedeutung hinsichtlich der Uropathogenität unterstreicht.

Das *hly*-Gencluster besaßen 28,3 % der Stuhl- und 37,5 % der Urinklone. Die Produktion von α -Hämolysin, einem porenbildenden Zytolysin, ist mit klinisch schwerer verlaufenden Harnwegsinfektionen assoziiert (Johnson *et al.*, 1991). Ikäheimo *et al.* fanden bei 35 % der Stämme, die eine Pyelonephritis auslösten, eine Hämolysin-expression (Ikäheimo *et al.*, 1994).

P-Fimbrien ließen sich bei 26,1 % der Stuhl- und 56,3 % der Urinklone nachweisen. Diese gelten als die wichtigsten Adhärenzfaktoren von uropathogenen *E. coli*-Bakterien. Källenius und Mitarbeiter fanden sie bei 91 % der Stämme, die eine akute Pyelonephritis auslösten, aber nur bei 19 % der Zystitis- und bei 14 % der ABU-Stämme. Im Stuhl gesunder Kontrollpersonen trugen sogar nur 7 % der Isolate P-Fimbrien (Källenius *et al.*, 1981). Die Virulenz P-Fimbrien tragender *E. coli* beruht aber nicht nur auf ihrer überlegenen Fitneß im Harntrakt selber, sondern auch auf der Fähigkeit, im Kolon zu siedeln und die notwendigen Schritte in Richtung akuter Infektion zu bewältigen (Plos *et al.*, 1995).

Das S-Fimbriengencluster besaßen 32,6 % der Stuhl- und 37,5 % der Urinklone. Sowohl P- als auch S-Fimbrien vermitteln eine gute Adhärenz an Tubulusepithelzellen *in vitro*, dennoch fand sich eine P-Fimbrien-Produktion bei den Urinstämmen weit häufiger. Die fehlende klinische Relevanz der S-Fimbrien wird durch das Tamm-Horsfall-Protein (THP) erklärt, das von Zellen der aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleifen und der distalen Tubuli gebildet und mit dem Urin ausgeschieden wird. Dieses hemmt die S-Fimbrien vermittelte Adhärenz an humane Tubuluszellen (Leeker *et al.*, 1996).

Typ-1-Fimbrien sind im allgemeinen bei Enterobakterien weit verbreitet (Hagberg *et al.*, 1981). Sie gehören sozusagen zur Grundausstattung der Bakterien und werden bei bis zu 80 % aller *E. coli*- Stämme des Darmes gefunden (Bloch *et al.*, 1992). Auch in dieser Studie konnte sowohl bei den Stuhl- als auch bei den Urinklonen stets ein sehr hoher Prozentsatz an positiven Stämmen nachgewiesen werden. Sie werden allerdings nicht notwendigerweise zur Persistenz im Darm benötigt (Bloch *et al.*, 1992). Gelangen sie jedoch sekundär in den Harntrakt, so beeinflussen Typ-1-Fimbrien durchaus die Virulenz der Erreger, da sie eine Voraussetzung für Persistenz und Wachstum in dieser Nische darstellen (Orndorff *et al.*, 1990). Sokurenko und Mitarbeiter fanden heraus, dass zufällige Punktmutationen im *fimH*-Gen zu einer besseren Bindung des Adhäsins an Mono-Mannosereste der uroepithelialen Glykoproteine führen und somit entscheidend dazu beitragen, daß aus harmlosen Dickdarmkommensalen uropathogene *E. coli*-Stämme entstehen (Sokurenko *et al.*, 1998). Darüber hinaus ermöglichen diese

Fimbrienadhäsine eine Bakterieninvasion und somit ein Überleben der Bakterien im Gewebe (Mulvey *et al.*, 2001). Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß 100 % der Urinklone, die in der aktiven Phase bzw. zu Zeiten der ABU isoliert wurden, das *fim*-Gencluster besaßen. Topley und Mitarbeiter vermuten außerdem, daß Typ-1-Fimbrien tragende *E. coli* den Vernarbungsprozeß in der Niere starten können (Topley *et al.*, 1989).

Die Rolle des zytotoxisch-nekrotisierenden Faktors 1 bei der Auslösung von Harnwegsinfektionen ist noch nicht eindeutig geklärt. Falbo und Mitarbeiter fanden jedoch bei der Untersuchung uropathogener *E. coli*-Bakterien heraus, daß die Produktion von CNF 1 eng mit der von Hämolyysin assoziiert ist. Dies beruht auf der Tatsache, daß die entsprechenden Gene auf dem Bakteriengenom benachbart sind (Falbo *et al.*, 1992). Hacker *et al.* hatten diese DNA-Regionen, in denen die Gene für Pathogenitätsfaktoren vereinigt sind, als Pathogenitätsinseln (PAIs) bezeichnet (Hacker *et al.*, 1990). In dieser Studie besaßen alle *cnf-1* positiven Stämme auch das *hly*-Gencluster. Bei jeweils 37,5 % der Urinklone konnten in der PCR *hly* und *cnf-1* nachgewiesen werden. Bei den Stuhlklonen waren 28,3 % *hly*-positiv, während nur 17,4 % das *cnf-1*-Gen besaßen.

5.2 Klinische Aktivität

Ursprünglich finden sich uropathogene *E. coli*-Bakterien in der Darmflora (Hultgren *et al.*, 1993). Es handelt sich also in den meisten Fällen um ascendierende Infektionen über das periurethrale Gewebe und die Harnröhre in die Blase. Von dort können die Bakterien unter Umständen weiter in die Niere wandern und eine Pyelonephritis auslösen.

Vergleicht man jedoch die Stuhlklone der inaktiven mit denen der aktiven Phase, so ließen sich keine bedeutenden Unterschiede bezüglich der Gencluster-Verteilung feststellen. Auch die aufgetretenen Genkombinationen ähnelten sich unabhängig von der klinischen Aktivität. Betrachtet man aber die phänotypischen Expressionsraten, so wurde das α -Hämolyysin zum Beispiel deutlich häufiger in aktiven als in inaktiven Zeiten produziert, was die Bedeutung dieses Toxins hinsichtlich der Pathogenese unterstreicht. Eine P-Fimbrien-Produktion konnte bei 100 % der inaktiven und bei

91,7 % der aktiven Stuhklone nachgewiesen werden. Diese spielen auf der einen Seite eine entscheidende Rolle bei der Persistenz der Bakterien im Darm, auf der anderen Seite dominierten *pap* positive Stämme bei der Auslösung einer Harnwegsinfektion bei Kindern (Plos *et al.*, 1995). S-Fimbrien wurden von den inaktiven Isolaten überhaupt nicht exprimiert, ihnen scheint daher bei der harmlosen Besiedelung des Kolons keine Bedeutung zuzukommen. Bei der Typ-1-Fimbrien-Produktion fand sich keine auffällige Häufigkeitsverteilung unter den Stuhklonen der einzelnen Aktivitätsstufen.

Im Gegensatz zu den Stuhklonen waren alle untersuchten Gencluster bei den Urinklonen der aktiven Phase häufiger zu finden als bei den Inaktiven. Das *fim*-Gencluster besaßen sogar alle aktiven Stämme, apathogene Isolate konnten dagegen nur in der inaktiven Phase nachgewiesen werden, was die Vermutung nahelegt, daß dieser Fimbrientyp unabdingbar notwendig für die Besiedelung des Harntrakts ist. Auch Orndorff und Mitarbeiter fanden eine direkte Korrelation zwischen Typ-1-Pili und der Potenz der Bakterien, Harnwegsinfektionen auszulösen (Orndorff *et al.*, 1990). Insgesamt war die Häufigkeitsverteilung der Gencluster bezüglich der klinischen Aktivität jedoch nicht so deutlich unterschiedlich, wie man eventuell erwartet hätte. In diesem Zusammenhang sollte man bedenken, daß die Isolate dieser Studie von Patientinnen gewonnen wurden, die an chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden. Fünfstück und Mitarbeiter fanden nämlich heraus, daß mit anhaltender Persistenz der Mikroorganismen deren Virulenz abnahm (Fünfstück *et al.*, 1997). Dies könnte auf einen vorgeschädigten Harntrakt oder eine abgeschwächte Immunabwehr der chronisch erkrankten Patientinnen zurückgeführt werden.

5.3 Phänotypische Expression

Einige *E. coli*-Isolate ein und desselben Klons unterschieden sich phänotypisch bei genotypischer Gleichheit. Dabei fanden sich Differenzen nur bezüglich der P-, S- und Typ-1-Fimbrien-Produktion, nicht bei der α -Hämolyseexpression.

Wenn nicht Fimbrien produzierende Stämme zu einem späteren Abnahmedatum gefunden wurden, wäre ein einfacher Erklärungsansatz, daß der Wirt zu diesem Zeitpunkt schon so geschwächt bzw. geschädigt war, so daß eine Fimbrien-Produktion nicht mehr notwendig war. In einigen Fällen wurden diese Fimbrienadhäsine aber am gleichen Abnahmetag nur von einem Teil der Isolate exprimiert. Bei den P-, S- und

Typ-1-Fimbriengenclustern ist bekannt, daß sie einer sog. Phasenvariation unterliegen, d.h. das An- und Abschalten einzelner Gene erfolgt rein zufällig (Foxman *et al.*, 1995a; Hacker, 1996). Wäre die phänotypische Expression also zu einem anderen Zeitpunkt untersucht worden, hätte sich eventuell ein anderes Ergebnis zeigen können. Außerdem darf man bei der Testung phänotypischer Expression *in vitro* nie vergessen, daß diese *in vivo* von vielerlei Umweltfaktoren abhängig ist, und somit die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse nur eingeschränkt auf *in vivo* Bedingungen übertragen werden dürfen (Smith, 1980).

Im Gegensatz dazu zeigten einige *E. coli*-Isolate phänotypisch ein positives Ergebnis, obwohl in der PCR das entsprechende Gencluster nicht nachgewiesen werden konnte. Hier lagen eventuell Wechselwirkungen zwischen nicht-fimbriellen Adhäsinen mit humanen bzw. bovinen Erythrozyten oder Hefezellen vor. Oder es könnten Variationen in der genetischen Struktur die Bindung des Primers in der PCR verhindert haben, so daß das Ergebnis falsch negativ ausfiel.

5.4 Identitäts-Screening

Alle 252 *E. coli*-Isolate dieser Studie wurden mit Hilfe der Rep-PCR näher charakterisiert. Daraufhin wurden alle Isolate, die das gleiche Rep-Bandenmuster aufwiesen und in ihrer Kombination an Pathogenitätsfaktoren übereinstimmten, zu einem Klon zusammengefaßt. Mindestens zwei *E. coli*-Isolate eines Klones, soweit vorhanden, wurden anschließend in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gegeneinander aufgetragen. Beide Methoden sind als sogenanntes genomisches Fingerprinting etabliert, so daß zu erwarten war, daß identische Stämme in der einen auch ein gleiches Muster in der anderen Methode zeigen würden, was auch in den meisten Fällen zutraf. Dennoch besitzen auch diese anerkannten Methoden keine 100 %ige Sensitivität. So zeigten zum Beispiel bei der Patientin Nr. 1 Isolate des Klons mit dem Rep-Muster Nr. 17 wenn auch ähnliche, so doch unterschiedliche PFGE-Bandenmuster (siehe Abb. 4). Bei gleicher genotypischer Struktur und identischem PFGE-Muster wiesen Isolate der Patientin Nr. 2 unterschiedliche, aber wiederum ähnliche Rep-PCR-Bandenmuster auf (siehe Tab. 4 und Abb. 7). Bei der Patientin Nr. 3 besaßen die Isolate 3I2,6, 3M3,5 und 3I5 sowohl in der Rep-PCR als auch in der PFGE

jeweils gleiche Bandenmuster, unterschieden sich allerdings in ihrer Genstruktur (siehe Tab. 5). Hier könnten die Bindungsstellen des Rep-Primers bzw. die Schnittstellen des Restriktionsenzymes unabhängig von dem entsprechenden Genomfragment gelegen haben, so daß sich keine Auswirkungen im Identitäts-Screening zeigten. Der Fehler könnte jedoch auch in der entsprechenden Genstruktur zu suchen sein, da zum Beispiel eine Punktmutation die Bindung des Primers verhindert haben könnte und so falsche Ergebnisse bezüglich der genotypischen Eigenschaften erzielt wurden. Betrifft die veränderte Genstruktur dagegen nur eine der beiden Methoden, so lassen sich zum Beispiel identische Rep- und unterschiedliche PFGE-Muster wie bei Patientin Nr. 8 erklären (siehe Tab. 7 und Abb. 14).

Eventuell ist es aber doch möglich, daß genetisch unterschiedliche Stämme gleiche Bandenmuster zeigen. Russo und Mitarbeiter, die *E. coli*- Isolate von 35 Frauen mit akuter Harnwegsinfektion mit Hilfe des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) untersuchten, fanden bei vier voneinander unabhängigen Stämmen identische Bandenmuster (Russo *et al.*, 1995).

5.5 Persistenz und rezidivierende Infektionen

Russo und Mitarbeiter bewiesen, daß 68 % aller rezidivierenden Infektionen durch *E. coli*- Isolate ausgelöst werden, die schon zu einem früheren Zeitpunkt isoliert werden konnten. 76 % dieser Infektionen waren Reinfektionen, 18 % beruhten auf bakterieller Persistenz im Harntrakt und in 6 % der Fälle blieb der Infektionsweg unklar. Bei 92 % der Reinfektionen konnte der Erreger auch aus einer Stuhlprobe angezüchtet werden, so daß die Darmflora als Reservoir der uropathogenen *E. coli* dient (Russo *et al.*, 1995).

P-Fimbrien sind unter anderem eine wichtige Voraussetzung zur möglichen Persistenz im Kolon (Plos *et al.*, 1995). Es ist außerdem unbestritten, daß nicht nur P-Fimbrien, sondern vor allem die Kombination mehrerer Pathogenitätsfaktoren die Virulenz der Erreger hinsichtlich einer akuten Harnwegsinfektion erhöhen. Zudem ist eine Persistenz Fimbrien tragender Stämme auf Vaginal- oder Rektumschleimhaut relativ häufig zu finden (Stapleton *et al.*, 1995). In jener Studie konnte allerdings kein direkter Zusammenhang zwischen der Persistenz Fimbrien positiver Stämme im Rektum und rezidivierenden Harnwegsinfektionen gefunden werden.

Betrachtet man dagegen persistierende *E. coli*- Isolate im Harntrakt, die über 30 Tage eine ABU auslösen, so sind apathogene Stämme den Fimbrien tragenden Isolaten überlegen (Andersson *et al.*, 1991). Nach jener Studie bieten Fimbrien-Adhäsine dem Wirt die Möglichkeit, diese Bakterien selektiv zu eliminieren. Die Theorie, daß die apathogenen Stämme Vorteile bezüglich der Wachstumsrate haben könnten, konnte nicht bestätigt werden. Man darf aber auch nicht außer Acht lassen, daß Andersson und Mitarbeiter nur Stämme der ABU untersuchten, die nicht in der Lage waren, akute Infektionsereignisse auszulösen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die persistierenden Stämme unterschiedliche Pathogenitätsfaktorkombinationen. Manche waren gänzlich apathogen und bei anderen konnten alle untersuchten Virulenzmerkmale nachgewiesen werden, so daß kein Zusammenhang zwischen Virulenz und Persistenz festgestellt werden konnte. Es wird allerdings deutlich, daß zwischen akuten und rezidivierend-chronischen Infektionen sowie der asymptomatischen Bakteriurie auf der einen und dem Virulenzprofil der Bakterien auf der anderen Seite differenziert werden muß.

Obwohl alle Patientinnen dieser Studie in ihrer Anamnese an rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden, konnte im Beobachtungszeitraum keine Reinfektion festgestellt werden, so daß hinsichtlich des Reinfektionsrisikos leider keine Aussage gemacht werden kann. Ikäheimo *et al.* konnten in ihrer Studie allerdings keinen Zusammenhang zwischen dem Virulenzprofil der ursprünglichen Erreger und rezidivierenden Infektionen nachweisen (Ikäheimo *et al.*, 1995).

5.6 Deletionen

Virulenz-assoziierte Gene liegen auf dem Bakterienchromosom oft in enger Nachbarschaft. Diese Regionen sind als Pathogenitätsinseln (PAIs) bezeichnet und bereits bei mehreren Enterobakterien gefunden worden. Blum *et al.* beschrieben zum Beispiel für den *E. coli*-Wildtyp J96 zwei Pathogenitätsinseln: Die PAI I trägt die Gene für *hly I* und *pap*, die PAI II diejenigen für *cnf-1*, *hly II* und *prs* (Blum *et al.*, 1995). Hacker *et al.* konnten nachweisen, daß diese Pathogenitätsinseln im Ganzen deletieren können. Diesen Vorgang beobachteten sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Hacker *et al.*, 1990). Es wurde vermutet, daß der Verlust gewisser Pathogenitätsfaktoren, sobald

sich der Mikroorganismus einmal im Wirt etabliert hat, Vorteile für den Erreger bringen könnte, indem er sich zum Beispiel leichter der Immunantwort durch den Wirt entziehen kann (Hacker *et al.*, 1990).

Auch in dieser Studie wurde auf mögliche Deletionsereignisse *in vivo* geachtet. Es fanden sich bei den Patientinnen Nr. 3 und Nr. 8 jeweils zwei Klone, die in der Rep-PCR das gleiche Bandenmuster ergaben, aber sich genotypisch durch den Besitz des *fim*-Genclusters unterschieden. Die entsprechenden Klone der Patientin Nr. 3 mit dem Rep-Muster Nr. 14 zeigten auch in der Pulsfeldgelelektrophorese ein identisches Bandenmuster (siehe Tab. 5), während die beiden Klone der Patientin Nr. 8 mit dem Rep-Muster Nr. 18 die deutlich unterschiedlichen PFGE-Muster XIV und XV aufwiesen (siehe Tab. 7 und Abb. 14). Da dieses Gencluster aber bisher nicht als Teil einer Pathogenitätsinsel bekannt ist, konnten keine Deletionen dieser Art nachgewiesen werden.

Vielleicht wurde für diesen Aspekt ein ungünstiges Patientengut ausgewählt. Die Umweltbedingungen bzw. die Immunabwehr der chronisch erkrankten Patientinnen könnte schon soweit verändert bzw. geschwächt sein, daß der Druck auf die Erreger nicht groß genug war, ihre immunogenen Strukturen zu verändern.

5.7 Acimethin-Langzeitmetaphylaxe

Akute Harnwegsinfektionen sind durch eine Vielzahl von antimikrobiellen Chemotherapeutika gewöhnlich einfach und wirksam zu bekämpfen. Trotzdem erleiden ungefähr 25 % aller Frauen innerhalb von sechs Monaten nach einer Erstinfektion ein Rezidiv (Foxman *et al.*, 1995b). Wird bei Patientinnen mit chronisch-rezidivierenden Harnwegsinfektionen eine dauerhafte Reinfektionsprophylaxe durchgeführt, kamen bisher in der Regel Antibiotika wie zum Beispiel Trimethoprim allein oder in Kombination mit Sulfonamiden zum Einsatz (Tauchnitz, 1996). Da Antibiotika aber Nebenwirkungen hervorrufen und auch Resistenzentwicklungen bewirken können, wurde nach neuen Therapiealternativen gesucht. Bei postmenopausalen Frauen senkte eine vaginale Östrogentherapie beispielsweise deutlich das Rezidivrisiko (Hooton, 2001).

Fünfstück *et al.* konnten zeigen, daß mit der Aminosäure L-Methionin (Acimethin®) eine wirksame Dauerprophylaxe durchgeführt werden kann. Der wesentliche

Behandlungserfolg ergab sich dabei durch die Beeinflussung der bakteriellen Zytoadhärenz (Fünfstück *et al.*, 1997). In dieser Studie konnten 19 Stuhl- und drei Urinklone unter Acimethin-Therapie isoliert werden. Wie in Abb. 39 dargestellt, fanden sich alle untersuchten Gene bei den Stuhlklonen ohne Acimethin® deutlich häufiger als bei denen mit dieser Therapie. Diese Beobachtung deckt sich weitgehend mit dem Ergebnis einer vorausgegangenen Studie, in der ebenfalls die entsprechenden Virulenzfaktoren außer *pap/prs* seltener unter einer Dauerprophylaxe nachzuweisen waren (Brauchle, 2002). Da die Darmflora als Erregerreservoir uropathogener *E. coli*-Bakterien dient, kann durch die verminderte Virulenz der Mikroorganismen eine niedrigere Infektionsrate erwartet werden. Es bleibt allerdings völlig unklar, auf welche Weise diese Wirkung eingetreten ist. Außerdem muß erwähnt werden, daß die Patientin Nr. 3 trotz Acimethin-Therapie eine akute Infektion erlitt, was beispielsweise aber auch auf mangelnde Compliance zurückgeführt werden könnte.

Von den unter dieser Therapie isolierten Urinklonen trugen zwei das *fim*-Gencluster, produzierten diese Fimbrien aber nicht. Der dritte Urinklon zeigte sich in der PCR für *hly*, *pap/prs*, *sfa/foc*, *fim* und *cnf-1* positiv. Phänotypisch konnte eine Hämolysin-, P- und Typ-1-Fimbrien-Expression nachgewiesen werden.

Sicherlich ist die Anzahl der unter dieser Therapie isolierten Stämme vorläufig zu gering, um eine Aussage über die Wirkungsweise von Acimethin® im Urin machen zu können. Es kann also nur spekuliert werden, ob durch die Ansäuerung des Harns möglicherweise eine Blockade der Expression bewirkt wird. Ebenso wäre es denkbar, daß die Virulenzfaktoren zwar weiterhin produziert werden, aber ihre Wirkung aus unbekanntem Gründen nicht entfalten können.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit jedoch deutlich, dass in vielen Fällen Erreger mit einer geringen Anzahl an Pathogenitätsfaktoren eine Infektion auslösen können. Somit sind neben dem Virulenzprofil der Bakterien noch eine Reihe von Wirtsfaktoren für den Verlauf einer Harnwegsinfektion entscheidend.

6 Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen gehören zu den häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen und werden überwiegend durch uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) ausgelöst. Die genaue Erforschung der Krankheitserreger durch molekularbiologische Verfahren könnte zur Entwicklung neuer diagnostischer Methoden sowie zu besseren Präventions- und Therapiestrategien führen.

In der vorliegenden Studie wurden 166 Stuhl- und 86 Urinisolate, die von Patientinnen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen gewonnen wurden, auf das Vorhandensein der Virulenzfaktoren α -Hämolysin, P-, S- und Typ-1-Fimbrien sowie den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 sowohl geno- als auch phänotypisch untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe der Rep-PCR und der Pulsfeldgelelektrophorese ein Identitäts-Screening durchgeführt, so daß sämtliche *E. coli*-Isolate zu 46 Stuhl- und 16 Urinklonen zusammengefaßt werden konnten.

Alle untersuchten Gene fanden sich bei den Urinklonen häufiger als bei den Stuhlklonen, dabei war das Typ-1-Fimbrien-Gencluster jeweils am häufigsten vorhanden. Im Gegensatz zu den Stuhlstämmen exprimierten alle *hly* positiven Urinstämme dieses Toxin auch, die Fimbrienproduktion überwog dagegen bei den Stuhlisolaten. Bezüglich der Klinik korrelierte die Pathogenität der Urinklone mit der Aktivitätsstufe, bei den Stuhlklonen konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden.

Bedingt durch den chronischen Krankheitsverlauf der Patientinnen wiesen die *E. coli*-Isolate dieser Studie ein geringeres pathogenes Potential auf als vergleichbare Isolate akuter Infektionsereignisse.

Es konnten keine Deletionen von Pathogenitätsinseln beobachtet werden.

Auffallend war, daß unter der Langzeitmetaphylaxe mit Acimethin® sämtliche untersuchten Pathogenitätsfaktoren seltener auftraten.

Bei der Beobachtung der einzelnen Patientinnen über einen längeren Zeitraum hinweg (Januar bis Oktober 1998) konnten mehrfach Persistenzen verschiedener Klone von bis zu 9 Monaten nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

1. **Andersson, P., I. Engberg, G. Lidin-Janson, K. Lincoln, R. Hull, S. Hull, C. Svanborg.** 1991. Persistence of *Escherichia coli* bacteriuria is not determined by bacterial adherence. *Infect. Immun.* **59**:2915-2921.
2. **Bloch, C. A., B. A. D. Stocker, P. E. Orndorff.** 1992. A key role for type 1 pili in enterobacterial communicability. *Mol. Microbiol.* **6**:697-701.
3. **Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschäpe, J. Hacker.** 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**:606-614.
4. **Blum, G., V. Falbo, A. Caprioli, J. Hacker.** 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and α -hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microb. Lett.* **126**:189-196.
5. **Blum-Oehler, G., A. Ritter, L. Emody, P. Klemm, P. B. Olsen, R. Marre, J. Hacker.** 1997. Die tRNA leuX als globaler Regulator der Virulenzeigenschaften des uropathogenen *Escherichia coli*-Stammes 536. In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 65-74.
6. **Brauchle, L.** 2002. Molekulare Untersuchungen zum Vorkommen von Pathogenitätsfaktoren bei *Escherichia coli* Isolaten aus Stuhl und Urin von Frauen mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Med. Doktorarbeit, Würzburg.
7. **Caprioli, A., V. Falbo, L. G. Roda, M. Rukggeri, C. Zona.** 1983. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations *Infect. Immun.* **39**:1300-1306.
8. **Donnenberg, M. S., R. A. Welch.** 1996. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. (Mobley H. L. T., J. W. Warren, Ed.), ASM Press, Washington DC, USA. pp. 29-66.

9. **Falbo, V., M. Famiglietti, A. Caprioli.** 1992. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. *Infect. Immun.* **60**:2182-2187.
10. **Foxman, B., L. Zhang, K. Palin, P. Tallman, C. F. Marrs.** 1995. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* **171**:1514-1521.
11. **Foxman, B., L. Zhang, P. Tallman, K. Palin, C. Rode, C. Bloch, B. Gillespie, C. F. Marrs.** 1995. Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. *J. Infect. Dis.* **172**:1536-1541.
12. **Fünfstück, R., N. Jacobsohn, H. Tschäpe, G. Stein.** 1997. Beeinflußt der ABO-, P₁- und Lewis-Blutgruppenstatus die Uropathogenität von *E. coli* bei Patienten mit chronischer Pyelonephritis? In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 157-168.
13. **Fünfstück, R., E. Straube, O. Schildbach, U. Tietz.** 1997. Reinfektionsprophylaxe durch L-Methionin bei Patienten mit einer rezidivierenden Harnwegsinfektion. *Med. Klin.* **92**:574-581.
14. **Georgopoulos, A., A. Buxbaum.** 1997. Chemotherapie – Grundlagen der Therapie aus bakteriologischer Sicht. In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 236-246.
15. **Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre, W. Goebel.** 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* **8**:213-225.
16. **Hacker, J., H. Kestler, H. Hoshützky, K. Jann, F. Lottspeich, T. Korhonen.** 1993. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infect. Immun.* **61**:544-550.
17. **Hacker, J.** 1997. Virulenzmerkmale uropathogener Bakterien. In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 27-35.

18. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, H. Tschäpe.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.
19. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, B. Janke, G. Nagy, W. Goebel.** 1999. Pathogenicity islands of extraintestinal *Escherichia coli*. In: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. (Kaper, J. B., J. Hacker, Ed.), ASM Press, Washington DC, USA. pp. 59-76.
20. **Hagberg, L., U. Jodal, T. K. Korhonen, G. Lidin-Janson, U. Lindberg, C. Svanborg Eden.** 1981. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect. Immun.* **31**:564-570.
21. **Herold, G.,** 1999. Harnwegsinfektionen. In: Innere Medizin. (Herold, G. Ed.), Köln, Germany. pp. 503-508.
22. **Hooton, T. M.,** 2001. Recurrent urinary tract infection in women. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**:259-268.
23. **Hultgren, S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, J. W. St. Geme III, S. Normark.** 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesions: assembly and function in cell recognition. *Cell.* **73**:887-901.
24. **Ikäheimo, R., A. Siitonen, U. Kärkkäinen, J. Mustonen, T. Heiskanen, P. H. Mäkelä.** 1994. Community-acquired pyelonephritis in adults: characteristics of *E. coli* isolates in bacteremic and non-bacteremic patients. *Scand. J. Infect. Dis.* **26**:289-296.
25. **Ikäheimo, R., A. Siitonen, T. Heiskanen, U. Kärkkäinen, P. Kuosmanen, P. Lipponen, P. H. Mäkelä.** 1995. Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women. *Clin. Infect. Dis.* **22**:91-99.
26. **Jacobson, S. H.** 1986. P-fimbriated *Escherichia coli* in adults with renal scarring and pyelonephritis. *Acta Med. Scand. Suppl.* 713:1-64.
27. **Johnson, J. R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:80-128.
28. **Källenius, G., R. Möllby, S. B. Svenson, I. Helin, H. Hultberg, B. Cedergren, J. Winberg.** 1981. Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Lancet.* **26**:1369-1372.

29. **Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert, R. M. Zinkernagel.** 2001. Enterobacteriaceae. In: Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. pp. 290-293.
30. **Kuhnert, P., J. Hacker, I. Mühldorfer, A. P. Burnens, J. Nicolet, J. Frey.** 1997. Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. Appl. Environ. Microbiol. **63**:703-709.
31. **Kunin, C. M.** 1994. Urinary tract infections in females. Clin. Infect. Dis. **18**:1-12.
32. **Leeker, A., B. Kreft, S. Kumar, K. Sack.** 1997. Tamm-Horsfall Protein: Differentielle Wirkung auf die Fimbrien-vermittelte Adhärenz von *Escherichia coli* an Nierenepithelzellen? In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 44-53.
33. **Leffler, H., C. Svanborg-Eden.** 1980. Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes. FEMS Microbiol. Lett. **8**:127-134.
34. **Ludwig, A., F. Garcia, S. Bauer, T. Jarchau, R. Benz, J. Hoppe, W. Goebel.** 1996. Analysis of the *in vivo* activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **178**:5422-5430.
35. **Mühldorfer, I., J. Hacker.** 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. Microb. Pathog. **16**:171-181.
36. **Mühldorfer, I., W. Ziebuhr, J. Hacker.** 1997. *Escherichia coli* in urinary tract infections. In: Molecular Medical Microbiology. (Sussman, M., Ed.), Academic press.
37. **Mulvey, M. A., J. D. Schilling, S. J. Hultgren.** 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. Infect. Immun. **69**:4572-4579.
38. **Orndorff, P. E., C. A. Bloch.** 1990. The role of type 1 pili in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections: a short review and some new ideas. Microb. Pathog. **9**:75-79.

39. **Oßwald, H.** 1997. Nieren- und Harnwegskrankheiten. In: Taschenbuch der Arzneibehandlung. (Scholz, H., U. Schwabe, Ed.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. pp. 207-224.
40. **Ott, M., J. Hacker, T. Schmoll, T. Jarchau, T. K. Korhonen, W. Goebel.** 1986. Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesion (*sfa*) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections. *Infect. Immun.* **54**:646-653.
41. **Plos, K., H. Connell, U. Jodal, B. Marklund, S. Marild, B. Wettergren, C. Svanborg.** 1995. Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *J. Infect. Dis.* **171**:625-631.
42. **Russo, T. A., A. Stapleton, S. Wenderoth, T. M. Hooton, W. E. Stamm.** 1995. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J. Infect. Dis.* **172**:440-445.
43. **Schaeffer, A. J.** 1997. Classification of urinary tract infection in adults. In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 140-147.
44. **Smith, H.** 1980. The effect of environmental conditions *in vivo* and *in vitro* on the determinants of microbial pathogenicity. In: The molecular basis of microbial pathogenicity. (Smith, H., J. J. Skehel, M. J. Turner, Ed.). Dahlem Konferenzen 1980. Weinheim: Verlag Chemie GmbH. pp. 159-172.
45. **Sokurenko, E. V., V. Chesnokova, D. E. Dykhuizen, I. Ofek, X. Wu, K. A. Krogfelt, C. Struve, M. A. Schembri, D. L. Hasty.** 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:8922-8926.
46. **Sökeland, J.** 1993. Infektionen der unteren Harnwege. In: Urologie. (Sökeland, J. Ed.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. pp. 184-185.

47. **Stapleton, A., T. M. Hooton, C. Fennell, P. L. Roberts, W. E. Stamm.** 1995. Effect of secretor status on vaginal and rectal colonization with fimbriated *Escherichia coli* in women with and without recurrent urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* **171**:717-720.
48. **Swenson, D., N. Bukanov, D. Berg, R. Welch.** 1996. Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infect. Immun.* **64**:3736-3743.
49. **Tauchnitz, C.** 1997. Therapie der unkomplizierten Harnwegsinfektion. In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 247-255.
50. **Topley, N., R. K. Mackenzie, R. Steadman, J. D. Williams.** 1989. *Escherichia coli* virulence and renal scarring. *J. Infect. Dis.* **160**:1081.
51. **Versalovic, J., T. Koeth, J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**:6823-6831.
52. **Warren, J. W.** 1996. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In: Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. (Moblely, H. L. T., J. W. Warren, Ed.), ASM Press, Washington DC, USA. pp. 3-28.
53. **Winberg, J., K. A. Karlsson, B.-I. Marklund, R. Möllby, S. Normark, M. Söderhäll, S. Teneberg and others.** 1997. The Pap G-adhesion at the tip of P-fimbriae provides *Escherichia coli* with special pathogenicity properties in experimental urinary tract infections (UTI) of cynomolgus monkeys. In: Harnwegsinfektion. Pathogenetische, klinische und therapeutische Aspekte. (Fünfstück, R., E. Straube, G. Stein, Ed.), Pabst Science Publishers, Lengerich, Germany. pp. 96-98.
54. **Woods, C. R., J. Versalovic, T. Koeth, J. R. Lupski.** 1993. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1927-1931.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

ABU	asymptomatische Bakteriurie
ACB	Antikörperbeladung
CNF 1	zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1
Hly	α -Hämolysin
HWI	Harnwegsinfektion
Leuko	Leukozyten
n.a.	nicht auswertbar
n.t.	not tested
PAI	Pathogenitätsinsel
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
rpm	rotations/minute
THP	Tamm-Horsfall-Protein
ÜN	über Nacht
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
z.w.	zu wenig
Zyto	Zytoadhärenz

8.2 Übersichtstabellen

Diese Tabellen zeigen die Gesamtergebnisse der genotypischen und phänotypischen Untersuchungen sowie des Identitäts-Screenings der einzelnen *E. coli*-Isolate.

Die folgende Legende bezieht sich auf die Tabellen 14-24:

Verwendete Abkürzungen:

Hly: Hämolyse auf Blutagarplatten; *hly*: α -Hämolysingencluster; P-Fim: P-Fimbrienexpression; *pap/prs*: P-Fimbriengencluster; S-Fim: S-Fimbrienexpression; *sfal/foc*: S-/F1C-Fimbriengencluster; Typ 1: Typ-1-Fimbrienexpression; *fim*: Typ-1-Fimbriengencluster; *cnf-1*: Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1-Gen; Rep: fortlaufende Nummer des Rep-PCR-Musters der jeweiligen Patientin; PFGE: fortlaufende Nummer des PFGE-Musters der jeweiligen Patientin; n.t.: nicht getestet; n.a.: nicht auswertbar.

Tab. 14 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 1

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
21.01.98(G)	1G1	-	+	-	-	-	+	-	+	-	13	XIV
	1G2	-	+	-	-	-	+	-	+	-	13	n.t.
	1G3	-	+	-	-	-	+	-	+	-	13	n.t.
	1G4	-	+	-	-	-	+	-	+	-	13	XIV
	1G5	-	+	-	-	-	+	-	+	-	13	n.t.
	1G6	-	+	-	-	-	+	-	+	-	13	n.t.
	1G1U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	12	XIII
	1G2U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	12	XIII
	1G3U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	12	n.t.
	1G4U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	12	n.t.
	1G5U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	12	XIII
	1G6U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	12	XIII
01.04.98(H)	1H1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12	XIII
	1H2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	14	XIV
	1H3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	14	XIV
	1H4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12	n.t.
	1H5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12	XIII
	1H6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12	n.t.
	1H1U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	XIII
	1H2U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1H3U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1H4U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	XIII
	1H5U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1H6U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfalfoc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
17.07.98(I)	1I1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	16	XIII
	1I2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I3	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	XIII
	1I4	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I5	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I1U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I2U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I3U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	XIII
	1I4U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I5U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I6U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	n.t.
	1I7U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	XIII
	1I8U	+	+	-	+	-	+	+	+	+	15	XIII
08.10.98(K)	1K1	-	-	+	+	-	-	-	+	-	17	XVI
	1K2	-	-	+	+	-	-	-	+	-	17	n.t.
	1K3	-	-	+	+	-	-	-	+	-	17	XVII
	1K4	-	-	+	+	-	-	-	+	-	17	n.t.
	1K5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	18	XVIII
	1K6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	18	XVIII
	1K1U	-	-	+	+	-	-	-	+	-	19	n.t.
	1K2U	-	-	+	+	-	-	-	+	-	19	XVI
	1K3U	-	-	+	+	-	-	-	+	-	19	n.t.
	1K4U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	20	XIX
	1K5U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	20	XX
	1K6U	-	-	+	+	-	-	-	+	-	19	XXI

Tab. 15 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 2

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfalfoc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
08.04.98(H)	2H1U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.a.
	2H2U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.t.
	2H3U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.t.
	2H4U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.t.
	2H5U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.a.
	2H6U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.t.
17.07.98(I)	2I1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	12	XI
	2I2	-	-	-	-	+	+	+	+	-	12	n.t.
	2I3	-	-	-	-	+	+	+	+	-	12	XI
	2I4	-	-	-	-	+	+	+	+	-	12	n.t.
	2I5	-	-	-	-	+	+	+	+	-	13	XI
	2I6	-	-	-	-	+	+	+	+	-	13	XI
	2I1U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.a.
	2I2U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.t.
	2I3U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	11	n.t.
	2I4U	-	-	-	-	-	-	+	+	-	11	n.a.
	2I5U	-	-	-	-	-	-	+	+	-	11	n.t.
	2I6U	-	-	-	-	-	-	+	+	-	11	n.a.

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
21.10.98(K)	2K1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	14	XII
	2K2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	15	XIII
	2K3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	15	XIII
	2K4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	15	n.t.
	2K5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	16	XI
	2K6	-	-	-	-	-	+	-	+	-	16	XI
	2K1U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	17	n.a.
	2K2U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	17	n.t.
	2K3U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	17	XIV
	2K4U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	17	n.t.
	2K5U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	17	n.t.
	2K6U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	17	n.t.

Tab. 16 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 3

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
28.01.98(I)	3I1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	13	XII
	3I2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	14	XIII
	3I3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	13	XII
	3I4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	13	n.t.
	3I5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	14	XIII
	3I6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	14	XIII
04.02.98(K)	3K1	-	-	+	-	-	-	+	+	-	15	XIV
	3K2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
	3K3	-	-	+	-	-	-	+	+	-	15	XIV
	3K4	-	-	+	-	-	-	+	+	-	15	XIV
	3K5	-	-	+	-	-	-	+	+	-	15	n.t.
12.02.98(L)	3L1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
	3L2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3L3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3L4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3L5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3L6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
25.02.98(M)	3M1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	16	XV
	3M2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	16	n.t.
	3M3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	14	XIII
	3M4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	16	XV
	3M5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	14	XIII
	3M6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	16	n.t.
11.03.98(N)	3N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	XVI
	3N2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
	3N3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	XVI
	3N4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	n.t.
	3N5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	5	V
	3N6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	5	n.t.

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfalfoc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
22.04.98(O)	3O1	-	+	-	-	-	+	-	+	-	18	XVII
	3O2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	5	V
	3O3	-	+	-	-	-	+	-	+	-	18	XVII
	3O4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
	3O5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3O6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3O1U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
	3O2U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3O3U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3O4U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3O5U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	3O6U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V

Tab. 17 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 5

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfalfoc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
25.03.98(C)	5C1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	6	VII
	5C2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	6	n.t.
	5C3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	6	n.t.
	5C4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	6	n.t.
	5C5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	6	n.t.
	5C6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	6	VII
	5C1U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7	VI
	5C2U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7	VI
	5C3U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7	VI
	5C4U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7	n.t.
	5C5U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7	n.t.
	5C6U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7	VI

Tab. 18 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr 8

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfalfoc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
11.03.98(F)	8F1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	13	X
	8F2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	14	XI
	8F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	n.a.
	8F4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	XII
	8F5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	13	X
	8F6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	n.a.

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
01.10.98(G)	8G1	-	-	+	+	-	-	+	+	-	17	XIII
	8G2	+	+	+	+	-	+	-	-	+	18	XIV
	8G3	+	+	+	+	-	+	-	+	+	18	n.t.
	8G4	-	-	+	+	-	-	+	+	-	17	n.t.
	8G5	-	-	+	+	-	-	+	+	-	17	XIII
	8G6	-	-	+	+	-	-	+	+	-	17	n.t.
	8G1U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	18	XV
	8G2U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	18	XV
	8G3U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	18	n.t.
	8G4U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	18	n.t.
	8G5U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	18	n.t.
	8G6U	+	+	+	+	-	+	+	+	+	18	XV

Tab. 19 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 11

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
19.03.98(B)	11B1	-	-	+	-	-	-	+	+	-	2	II
	11B2	-	-	+	-	-	-	+	+	-	2	n.t.
	11B3	-	-	+	-	-	-	+	+	-	2	n.t.
	11B4	-	-	+	-	-	-	+	+	-	2	n.t.
	11B5	-	-	+	-	-	-	+	+	-	2	n.t.
	11B6	-	-	+	-	-	-	+	+	-	2	II
01.07.98(C)	11C1U	-	-	-	+	-	-	-	+	-	3	III
	11C2U	-	-	-	+	-	-	-	+	-	3	III
	11C3U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	IV
	11C4U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	IV
	11C5U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	V
	11C6U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	IV

Tab. 20 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 16

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
04.03.98(B)	16B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1	I
	16B2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	4	IV
	16B3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5	V
	16B4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5	V
	16B5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1	I
	16B6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1	I

Tab. 21 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 19

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim.	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
24.07.98(A)	19A1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	1	I
	19A2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	1	I
	19A3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	1	n.t.
	19A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	II
	19A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	n.t.
	19A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	II
27.07.98(B)	19B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	II
	19B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	n.t.
	19B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	n.t.
	19B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	n.t.
	19B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	II
	19B6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	n.t.
30.07.98(C)	19C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	II
	19C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	II
	19C3	-	-	+	-	-	-	+	+	-	3	III
	19C4	-	-	+	-	-	-	+	+	-	3	III
	19C5	-	-	+	-	-	-	+	+	-	3	n.t.
	19C6	-	-	+	-	-	-	+	+	-	3	III

Tab. 22 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 20

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
24.08.98 (A)	20A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	I
	20A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A1U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	I
	20A2U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A3U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A4U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A5U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	n.t.
	20A6U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	I
26.08.98 (B)	20B1	+	+	-	+	-	+	-	+	+	1	I
	20B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	II
	20B3	+	+	-	+	-	+	-	+	+	1	I
	20B4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	I
	20B5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	I
	20B6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	1	n.t.
03.09.98 (C)	20C1	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	III
	20C2	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	n.t.
	20C3	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	n.t.
	20C4	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	n.t.
	20C5	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	n.t.
	20C6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	3	III

Tab. 23 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 21

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
23.09.98(A)	21A1	-	+	+	+	-	-	-	+	-	1	I
	21A2	-	+	+	+	-	-	-	+	-	1	n.t.
	21A3	-	+	+	+	-	+	+	+	-	2	II
	21A4	-	+	+	+	-	-	-	+	-	1	n.t.
	21A5	-	+	+	+	-	+	+	+	-	2	II
	21A6	-	+	+	+	-	-	-	+	-	1	I
02.10.98(B)	21B1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3	III
	21B2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3	n.t.
	21B3	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3	n.t.
	21B4	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3	III
	21B5	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3	n.t.
	21B6	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3	III

Tab. 24 Übersicht über die *E. coli*-Isolate der Pat. Nr. 22

Datum	Stamm-Nr.	Hly	<i>hly</i>	P-Fim	<i>pap/prs</i>	S-Fim	<i>sfal/foc</i>	Typ 1	<i>fim</i>	<i>cnf-1</i>	Rep	PFGE
02.10.98(A)	22A1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	1	I
	22A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	II
	22A3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	1	I
	22A4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	1	n.t.
	22A5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	1	n.t.
	22A6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	1	n.t.
07.10.98(B)	22B1	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	III
	22B2	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	n.t.
	22B3	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	n.t.
	22B4	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	n.t.
	22B5	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	n.t.
	22B6	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	n.t.
	22B1U	-	-	+	+	-	-	+	+	-	3	III
	22B2U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	II
	22B3U	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	n.t.
	22B4U	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	III
22B5U	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	n.t.	
22B6U	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	n.t.	
21.10.98(C)	22C1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4	IV
	22C2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
	22C3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C1U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	V
	22C2U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C3U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C4U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C5U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.
	22C6U	-	-	-	-	-	-	-	+	-	5	n.t.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. J. Hacker für die interessante Themenstellung, die Überlassung des Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie seine freundliche Führung bedanken.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. R. Fünfstück und seinen Mitarbeitern von der Universität in Jena für die zuverlässige Bereitstellung der Stuhl- und Urinproben.

Dr. G. Blum-Öhler darf ich für die hervorragende Betreuung, ihre Unterstützung und unermüdliche Hilfsbereitschaft danken. Sie stand mir sowohl während der praktischen Phase im Labor als auch anschließend stets mit Rat und Tat zur Seite.

Außerdem gilt auch meinen Laborkollegen, vor allem Britta und Uli, Dank für anregende Diskussionen und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Carola und Yves danke ich für ihre geduldige Hilfe in allen Computerangelegenheiten.

Bei Christian möchte ich mich für das Korrekturlesen und seine moralische Unterstützung bedanken.

Besonderen Dank schulde ich nicht zuletzt auch meinen Eltern, ohne die mein Medizinstudium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maria Maibaum
Anschrift	Wolfgang-Höfer-Str. 9, 85049 Ingolstadt
Geburtsdatum	15. Oktober 1974
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1981-06/1985	Weiherhof-Grundschule, Freiburg
08/1985-06/1994	Friedrichs-Gymnasium, Freiburg
06/1994	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1994-09/1995	Studium der Humanmedizin, Universität Freiburg
10/1995-09/1997	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
09/1996	Ärztliche Vorprüfung
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1997-03/2000	Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg
04/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000-03/2001	Praktisches Jahr: 1. und 3. Tertial: Gynäkologie/Geburtshilfe und Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik, Würzburg 2. Tertial: Chirurgie, Nuevo Hospital Civil de Guadalajara, Guadalajara, Mexico
05/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Erfahrung

seit 08/2001

Ärztin im Praktikum,
Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Ingolstadt

Ingolstadt, im September 2002