

Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. J. Vogel

**Untersuchungen zur Verbreitung von Virulenzfaktoren
extraintestinal pathogener *Escherichia coli*-Stämme bei Isolaten
boviner Mastitiden**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität

Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth Reichardt

aus Jena

Würzburg, August 2010

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

Koreferent: Prof. Dr. Ulrich Vogel

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.1.2011

Die Promovendin ist Zahnärztin

Ich widme diese Arbeit meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Charakterisierung des Erregers <i>E. coli</i>	1
1.1.2. Eigenschaften – der Aufbau des <i>E.coli</i> -Genoms und dessen Plastizität.....	1
1.2. Epidemiologie	6
1.3. Pathogenitätsfaktoren uropathogener <i>E. coli</i>	7
1.3.1. Adhäsine.....	9
1.3.2. Fimbrienadhäsine.....	10
1.3.3. Nicht-fimbrien Adhäsine.....	12
1.3.4. Eisenaufnahmesystem.....	13
1.3.5. Toxine.....	14
1.3.6. Kapseln.....	16
1.3.7. Lipopolysaccharide.....	18
1.3.8. Coliforme Mastitis bei Rindern.....	20
1.4. Aufgabenstellung	22
2. Material und Methoden	24
2.1. Chemikalien.....	24
2.2. Nähr – und Selektivmedien.....	24
2.3. Bakterienstämme.....	25
2.4. Puffer für die verschiedenen Gelektrophoresen.....	26
2.5. Primerpaare.....	26
2.6. Stammhaltung und Anzucht der Bakterien.....	28
2.7. Phänotypische Tests.....	29
2.8. Polymerasekettenreaktion.....	29
2.9. Southern-Blot-Hybridisierung.....	32
3. Ergebnisse	35
3.1. Phänotypische Tests.....	35
3.2. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) zum Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren.....	35
3.3. Quantitative Bestimmung von genetischen Virulenzfaktor-Mustern in den Mastitis-assoziierten ExPEC.....	42
3.4. Häufigkeitsverteilung der Gene (Gesamtanalyse).....	43

3.5. Phylogenetische Einteilung der ECOR-Gruppen.....	48
3.6. Vergleich der ECOR-Gruppen.....	53
3.7. Vergleich tierspezifischen Virulenzfaktoren der ECOR-Gruppen.....	53
4. Diskussion.....	56
4.1. Auswertung der Gesamtanalyse.....	60
4.2. Prävalenz der Virulenzfaktoren in den phylogenetischen ECOR-Gruppen.....	64
4.3. Prävalenz der tierspezifischen Virulenzfaktoren in den ECOR-Gruppen.....	66
4.4. Analyse der <i>E. coli</i> -Isolate, die mit chronischer Mastitis assoziiert sind.....	67
4.5. Abschließende Diskussion und praktische Konsequenzen.....	67
5. Zusammenfassung.....	70
6. Literaturverzeichnis.....	72
7. Anhang.....	85
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	116

Danksagung

Lebenslauf

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Kapitel 1, Tabelle 1: Mobile und akzessorische genetische Elemente bei <i>E. coli</i>	3
Kapitel 1, Tabelle 2: An der Genomplastizität beteiligte Mechanismen.....	4
Kapitel 1, Tabelle 3: Einteilung der <i>E. coli</i> - Pathotypen.....	8
Kapitel 2, Tabelle 4: verwendete Bakterienstämme.....	25
Kapitel 2, Tabelle 5: Primer der Multiplex- Polymerasen- Kettenreaktion.....	26
Kapitel 2, Tabelle 6: Promega-Taq-Polymerasen- Reaktionsansatz.....	30
Kapitel 3, Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der Gene in % (Geamtanalyse).....	45
Kapitel 3, Tabelle 8: Virulenzfaktorverteilung der 222 <i>E. coli</i> -Stämme.....	46
Kapitel 3, Tabelle 9: Virulenzfaktorverteilung der mit chronischer Mastitis assoziierter <i>E. coli</i> -Isolate.....	48
Kapitel 3, Tabelle 10: A-Gruppe (klinisch).....	49
Kapitel 3, Tabelle 11: A-Gruppe (chronisch).....	50

Kapitel 3, Tabelle 12: A-Gruppe (subklinisch).....	50
Kapitel 3, Tabelle 13: B1-Gruppe (klinisch).....	50
Kapitel 3, Tabelle 14: B1-Gruppe (chronisch).....	51
Kapitel 3, Tabelle 15: B2-Gruppe (klinisch).....	51
Kapitel 3, Tabelle 16: B2-Gruppe (chronisch).....	51
Kapitel 3, Tabelle 17: D-Gruppe (klinisch).....	51
Kapitel 3, Tabelle 18: Genkombinationen der ECOR-Gruppen > 5VF.....	52
Kapitel 3, Tabelle 19: Prävalenz der spezifisch tierpathogenen Adhäsine in <i>E. coli</i> , die von boviner Mastitis isoliert wurden.....	54
Kapitel 7, Tabelle 20: PCR-Ergebnisse der 222 <i>E. coli</i> Stämme.....	85
Kapitel 2, Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Kapillarblots.....	33
Kapitel 3, Abbildung 2: Phänotypischer Test <i>hlyA</i>	35
Kapitel 3, Abbildung 3: Bandenmuster der Pool 1-spezifischen Multiplex-PCR.....	37
Kapitel 3, Abbildung 4: Bandenmuster der Pool 2- spezifischen Multiplex-PCR.....	38
Kapitel 3, Abbildung 5: Bandenmuster der Pool 3-spezifischen Multiplex-PCR.....	39
Kapitel 3, Abbildung 6: Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR.....	40
Kapitel 3, Abbildung 7: Bandenmuster der Pool 5-spezifischen Multiplex-PCR.....	41
Kapitel 4, Abbildung 8: Evolution der bakterieller Varianten durch Acquisition und Verlust genetischer Information.....	58

1. Einleitung

1.1. Charakterisierung des Erregers *E. coli*

1.1.2. Allgemeine Eigenschaften - der Aufbau des *E. coli* Genoms und dessen Plastizität

Die *Enterobacteriaceae* (griech. „enteron“: Darm) gehören zur Klasse der gamma-Proteobacteria, welche insgesamt 40 Gattungen und 200 Spezies umfasst. *Escherichia coli* (abgekürzt *E. coli*), *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. sind dabei die wichtigsten klinischen Vertreter. Benannt wurde *E. coli* 1919 nach seinem Entdecker Theodor Escherich, der die Bakterienart im Jahre 1885 erstmals aus dem Stuhl von Säuglingen als *Bakterium coli commune* entdeckte und beschrieb (Willinger, 1992; Selbitz, 1992).

E. coli zählt zu den am besten untersuchten Organismen der Welt. Es ist ein Gram-negatives, nicht Sporenbildendes, nicht Säurefestes Stäbchenbakterium, welches im menschlichen und tierischen Darm vorkommt. Es erreicht eine Länge von 2,0 bis 6,0 µm und eine Breite von 1,1 bis 1,5 µm. Biochemisch ist der laktosepositive Keim gut von anderen Enterobakterien abzugrenzen. Dieser fakultativ anaerobe Mikroorganismus besitzt die Fähigkeit, Energie sowohl durch Atmung als auch durch „Gemischte Säuregärung“ zu gewinnen. Die Anwesenheit von *E. coli* im Darm führt zu einem dauerndem Training des Mukosa-Immunsystems und fördert die Produktion von sekretorischem Immunglobulin A. Weiterhin produziert es Vitamin K. Man unterscheidet bei *E. coli* drei Gruppen von Serotypen: „O“ für die Lipopolysaccharide, „H“ (von „mit Hauch wachsende Bakterien“) für die Flagellen und „K“ für die Kapsel. Es gibt circa 180 „O“-Serogruppen und circa 50 „H“-Typen bei *E. coli*. Die Serotypisierung ist nach wie vor ein häufig angewandtes diagnostisches Werkzeug. Allerdings lässt die Bestimmung der Serogruppe nicht gleichzeitig auf die Virulenz des *E. coli*- Stammes schließen, so dass sich manche pathogene *E. coli*-Isolate erst nach der genotypischen Untersuchung als solche identifizieren lassen (Janssen et al., 2001; Janssen, 2002; Delicato et al., 2003; Ewers et al., 2004).

Genomstruktur bei *E. coli*

Das zeitliche Erscheinen von Enterobakterien in der Evolution ist relativ neu und stark an das Auftreten von Tieren gebunden, die ihnen die Möglichkeit zur Kolonisation im Darm ermöglichten. Dabei wirkt ein hoher Selektionsdruck auf die Bakterien, die sich innerhalb der verschiedenen ökologischen Nischen durch Spezialisierung und gezielte Anpassung der Stämme durchsetzen müssen. Grund dafür ist die hohe Bakteriendichte (10^9 Bakterien pro g Faeces) die zu einem Evolutionswettbewerb führt. Die Aufteilung in verschiedene „Pathovare“ die z.B. bei *E. coli* gefunden wurden, ist vermutlich die Folge dieser evolutionären Entwicklung. Dafür spricht auch das Vorhandensein von Genombereichen, die bei allen *E. coli*-Varianten konserviert sind (Kerngenom) und Gene zur Sicherung des Überlebens der Bakterienzelle beinhalten (z.B. Gene für essentielle zelluläre Funktionen) (Hutchinson et al., 1999; Hacker und Carniel, 2001). Untersuchungen zur Struktur und Zusammensetzung des *E. coli*-Genoms deuten darauf hin, dass der konservierte Teil des *E. coli* K-12 Stammes MG1655, etwa 3100 translatierbare „open reading frames“ (ORFs) umfasst (Dobrindt et al., 2002a). Zusätzlich existieren variable Genomanteile (flexibler Genpool), welche z.B. für Virulenzfaktoren kodieren und die Anpassung an die unterschiedlichen Wirtsbedingungen ermöglichen. In vielen Fällen repräsentieren diese Genomregionen mobile genetische Elemente (Dobrindt et al., 2002a). Diese mobilen Elemente ermöglichen einen schnellen horizontalen Transfer in andere Bakterien und führen zu einer erhöhten Dynamik des Genoms. Eine weitere Anpassung, aber insgesamt langsamere evolutionäre Entwicklung, ist die Veränderung des genetischen Materials durch Punktmutation (Arber, 1993; Dobrindt und Reidl, 2000; Dobrindt et al., 2002a). Zur Identifizierung der erworbenen genetischen Information kann der GC-Gehalt dienen. Im Durchschnitt ist die Zusammensetzung der DNA einer Bakterienspezies relativ konstant. Es wird daher angenommen, dass DNA-Sequenzen mit einem höheren oder niedrigeren GC-Gehalt (im Vergleich zum durchschnittlichen GC-Gehalt der Bakteriengenome) von anderen Bakterienarten erworben wurden. Im Fall des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 könnten vermutlich 18% aller offenen Leseraster (ORFs) durch horizontalen Gentransfer erworben worden sein (Lawrence und Ochman, 1998).

Der flexible Teil des *E. coli*-Genoms dagegen ist für dessen unterschiedliche Größe verantwortlich, die zwischen 4,6 und 5,5 Mb liegen kann (Bergthorsson und Ochman, 1998; Ochman und Jones, 2000). Die unterschiedlichen Genomgrößen resultieren aus dem Erwerb und Verlust verschiedener mobiler DNA-Elemente und anderer genomischer Regionen (Nataro und Kaper, 1998; Dobrindt und Hacker, 1999). Die Beobachtung von Insertionen und Deletionen von wenigen Basenpaaren bis zu einer Größe von 100 kb bei *E. coli* bestärkte diese Vermutungen (Hacker und Kaper, 1999; Rode et al., 1999; Perna et al., 2001). Die folgende Tabelle zeigt mögliche Bestandteile des flexiblen Teil des *E. coli*-Genoms:

Tab. 1: Mobile und akzessorische genetische Elemente bei *E. coli*:

DNA Elemente	Kodieren z.B. für
„Genomic islands“ größer als 10 kb	Pathogenitätsfaktoren, Fitnessfaktoren
„Genomic islets“ kleiner als 10 kb	Antibiotikaresistenzen, Virulenz- und Fitnessfaktoren
Bakteriophagen	Toxine, Effektoren, Virulenzfaktoren
Plasmide	Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenzen
IS Elemente, Transposons, Integrons	Antibiotikaresistenzen, Transposase, Integrase, Toxine, Virulenzfaktoren

(Dobrindt und Hacker, 2001)

Diese DNA-Elemente können an unterschiedlichen Stellen im Genom lokalisiert sein. Sie sind entweder Teil des Chromosoms oder unabhängig davon, als extrachromosomale Elemente zu finden (Dobrindt et al., 2002a; Dobrindt et al., 2004; Dobrindt 2005; Ahmed et al., 2008).

Die verschiedenen pathogenen *E. coli*-Stämme besitzen individuelle Pathogenitätsfaktoren, kodiert durch die entsprechenden Virulenzgene, welche oft zum flexiblen Teil des Genoms gehören (Kaper et al., 2004). Bei apathogenen Stämmen fehlen diese zumeist. Die Weitergabe an andere Bakterien ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 2: An der Genomplastizität beteiligte Mechanismen

Mechanismus	Effekt auf den Genomgehalt
Transformation	Führt zum Erwerb von Genen
Transduktion	
Konjugation	
Deletion	Kann zum Verlust (funktionaler) Gene führen oder den Genomgehalt und die Funktionalität unbeeinflusst lassen
Genetische Neuordnung	
Mutation	

(Dobrindt und Hacker, 2001)

Auch der Verlust von Pathogenitätsfaktoren durch Deletionen trägt zur Variabilität der Genome (pathogener) *E. coli* bei. Darüber hinaus wurden verschiedene ORFs sogar nicht im Genom pathogener *E. coli* nachgewiesen, hingegen aber bei apathogenen Stämmen. Es wird vermutet, dass diese Anwesenheit bei apathogenen Stämmen der Expression von so genannten „Virulenzrepressoren“ dient und die Ausprägung der Pathogenitätseigenschaften unterdrückt. Dieses lässt sich am Beispiel des Virulenzsupressorgens *ompT* darstellen. Das für eine Oberflächenprotease kodierende Gen fehlt bei Shigellen und enteroinvasiven *E. coli*. Bei apathogenen und extraintestinal pathogenen *E. coli* konnte es aber nachgewiesen werden. *OmpT* greift direkt in die Expression des *Shigella* VirG Proteins ein, unterdrückt dadurch die intrazelluläre Ausbreitung sowie die Virulenz (Nakata et al., 1993). Maurelli und Mitarbeiter konnten 1998 diese Vermutung durch Untersuchungen des *cadA* Gens bestätigen. *CadA* ist Bestandteil des Genoms von 90% aller *E. coli*-Stämme (es kodiert für die Lysin-Decarboxylase, die wiederum eine katalytische Funktion bei Reaktionen von Cadaverin einnimmt). Eine typische pathoadaptive Mutation von *Shigella* und enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) ist die Inaktivierung des *cad* locus. Die Lysin-Decarboxylase, welche für die pH-Homöostase und die weitere Reaktion von Cadaverin wichtig ist, kann somit nicht aktiv werden. In *E. coli* kodiert das *cadBA*-Operon für die Lysin-Decarboxylase *CadA* und den Lysin-Cadaverin-Antiporter *CadB*. Beide unterliegen der Kontrolle durch *CadC*, einem Protein der Zytoplasmamembran. *CadC* dient als Signalsensor und Regulator der Transkription in Abhängigkeit eines niedrigen pH's, sowie Lysin-Signalen. Ein extrem saures Milieu führt daher bei *Shigella* und EIEC zu einer

Repression des *cadC*-Gens und zu einer Anpassung durch das so genannte „adaptive acid-resistance system“ (AR3) (Casalino et al, 2009). Cadaverin steht am Ende dieser Reaktionskette und hemmt die Ausbildung eines *Shigella*-Enterotoxins, was zu einer Attenuierung der Stämme führt. Cadaverin beeinflusst die von den Shigellen ausgelöste proinflammatorische Reaktion durch die Entzündungszellen negativ. Im intestinalen Epithel wird die Migration der PMNs verhindert. Die Shigellen sind somit nicht mehr fähig, eine Lyse der phagozytotischen Vakuolen auszulösen. Das Bakterium kann nicht mehr mit dem Zytoskelett interagieren (Dorman, McKenna, Beloin, 2001; Fernandez et al., 2001). Pathogenen *Shigella*-Varianten und enteroinvasiven *E. coli* fehlt jedoch dieses *cadA*-Gen, was deren Virulenz verstärkt. Das Fehlen des *cadA* Gens ist auf eine Deletion zurückzuführen („black hole“) (Maurelli et al., 1998).

Die (Weiter-)Entwicklung molekularbiologischer Techniken, wie z.B. die DNA-Array-Technik sowie die routinemäßige komplette Genomsequenzierung, ermöglicht den Vergleich ganzer Genome. So wurden u.a. der *E. coli* K-12 Stamm MG1655 mit Vertretern verschiedener *E. coli*-Pathotypen durch DNA-DNA-Hybridisierung verglichen (Dobrindt et al., 2002 a/b; Dobrindt et al., 2003) Die Sequenzierung verschiedener kompletter *E. coli* Genome, wie z.B. auch die des K-12 Stammes MG1655 waren Voraussetzung für die verschiedenen Verfahren (Blattner et al., 1997). Die Untersuchungen zeigten, dass 5 bis 10 % der translatierbaren ORFs des *E. coli* K-12 Stammes MG1655 bei pathogenen und apathogenen Spezies nicht vorhanden sind. 50 bis 60 % davon waren funktionell hypothetisch, unklassifiziert oder von unbekannter Funktion (Dobrindt und Reidl, 2000; Dobrindt et al., 2002 a/b; Dobrindt et al., 2003; Welch et al., 2004; Dobrindt, 2005; Chen et al., 2006; Brzuszkiewicz et al., 2006). Diese Ergebnisse spiegeln die enorme Genomplastizität von *E. coli* wider.

Pathogenitätsinseln (PAIs)

Die Verbreitung von Virulenzfaktoren kann bei *E. coli* sehr stark variieren. Die jeweiligen Virulenzgene befinden sich häufig auf Bakteriophagen, Plasmiden oder distinkten Bereichen des Bakterienchromosoms, so genannten Pathogenitätsinseln (PAIs) (Mühdorfer und Hacker, 1994; Dobrindt et al., 2004). Sie wurden in pathogenen Erregern nachgewiesen, in weniger pathogenen oder apathogenen Stämmen einer

Spezies, oder deren verwandte Stämmen waren sie dagegen nicht oder nur fakultativ vorhanden (Hacker et al., 1990; Blum et al., 1994; Hacker und Kaper, 1999). PAIs sind häufig mit tRNA Genen assoziiert und von repetitiven Elementen („direct repeats“ – DR) umgeben. Es sind instabile DNA-Abschnitte größer als 10 kb. Es wird vermutet, dass PAIs durch so genannten horizontalen Gentransfer erworben wurden. Dafür spricht der GC-Gehalt der PAI-Gene, der sich von dem der anderen Genen des Wirtsorganismus unterscheidet (Groisman und Ochman, 1996; Hacker et al., 1997; Hacker und Kaper 1999; Ölschläger et al 2002; Hacker et al., 2003; Dobrindt et al., 2004; Schmidt & Hensel, 2004). Auch die Assoziation mit tRNA-Genen, die als chromosomale Integrationsstelle für die Fremd-DNA dienen, spricht für diese Vermutung. Außerdem besitzen die PAIs oft Mobilitätsgene (z.B. solche für Integrasen, Transposasen und Origins der Plasmidreplikation). Es wird deshalb angenommen, dass sich PAIs aus chromosomal integrierten Phagen, Plasmiden oder Transposons entwickelt haben, die man als „Pre-PAIs“ bezeichnet. Die „Pre-PAIs“ sind wahrscheinlich von großem Nutzen für die Bakterien, um ihre Fitness zu erhöhen. Die für die Mobilität kodierenden Gene sind verändert oder nicht mehr aktiv. Kommt es zu einer Deletion der kompletten PAIs, erfolgt dieses durch ortsspezifische Rekombination an flankierenden „direct repeats“ an den PAI-Enden. Fehlen diese, sind die PAIs nachweislich stabiler (Hochhut et al., 2006; Middendorf et al., 2004, Hacker et al., 1999; Blum et al., 1994).

1.2. Epidemiologie der bovinen Mastitis

Mastitis ist eine viel verbreitete Erkrankung bei Milchkühen, die vorwiegend auf einer Infektion durch Streptokokken und *Escherichia coli* beruht. Nach eingetretener Infektion verläuft die Mastitis akut oder chronisch. Der akuten Form wird in diesem Zusammenhang eine mäßige Heilungsprognose nachgewiesen, die chronische Verlaufsform erreicht sogar nur eine geringe Heilungsaussicht. Die Milchertragseinbußen durch vorzeitige Schlachtung, oder Antibiotikabehandlung der Kühe verursachen pro Jahr einen Verlust von 150-200 Euro pro Kuh. Dabei liegt der finanzielle Schaden in Deutschland in Höhe von 0,75 - 1 Milliarde Euro im Jahr. Die subklinische Mastitisform tritt 20 – 50-mal häufiger auf, als die klinische Form und ist

daher von besonderem Interesse bei der möglichen Prävention der Mastitiserkrankung (Sobiraj, 1997; Hamann, 2002).

1.3. Pathogenitätsfaktoren extraintestinal pathogener *E. coli*

E. coli besiedeln den Gastrointestinaltrakt des Menschen wenige Stunden nach der Geburt. Normalerweise leben sie ohne störenden Einfluss in der Mukosaschicht des Darmes. Dies ändert sich, sobald die gastrointestinale Barriere durchbrochen wird, wie es zum Beispiel bei einer Peritonitis der Fall ist.

E. coli sind hoch angepasste Symbionten der Darmflora, die jedoch auch außerhalb des Gastrointestinaltraktes unter anderen Umweltbedingungen eine ökologische Nische finden können. In diesen extraintestinalen Habitaten sind sie ebenfalls in der Lage Infektionskrankheiten auszulösen. Dabei unterscheiden sich die *E.coli*-Pathotypen in der Kombination ihrer Virulenzfaktoren und werden in 2 Hauptgruppen eingeteilt:

1. Intestinale Diarrhoe-Erkrankungen, hervorgerufen durch intestinal pathogene *E. coli* (IPEC) und 2. Extraintestinale Infektionen Harnwegsinfektionen ausgelöst durch so genannte extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC). Harnwegsinfektionen (UTIs) machen dabei den größten Teil der extraintestinalen schweren Infektionen aus. Darüber hinaus verursachen ExPEC auch Sepsis und Neugeborenen-Meningitis beim Menschen (Meningitis-assoziierte *E. coli*, MNEC) sowie systemische Infektionen in Tieren (Nataro, Kaper, 1998; Kaper, Nataro, Mobley, 2004).

Sechs der besonders gut untersuchten intestinalen *E. coli*-Pathotypen werden in der nachfolgenden Tabelle näher beschrieben (Kaper et al. 2004):

Tab. 3: Einteilung der *E. coli*- Pathotypen

<i>E. coli</i> Pathotypen	Lokalisation / Mechanismen	Spezifische Virulenzfaktoren	Art der Infektion
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	extrazellulär, Anheftung an kleine, schüsselförmige Enterozyten, Zerstörung der Mikrovilli	BFP - bundle-forming-pilus: verbindet EPECs, LEE Pathogenitätsinsel, Nucleolin : Shuttle-Protein zwischen Nukleus und Zytoplasma	Entzündungsreaktion („attaching and effacing lesion“) Diarrhoe
Enterohaemorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	extrazellulär, boviner Intestinaltrakt, Läsion durch Anheftung und Beseitigung/Auslöschung	Bildet Shigatoxin (Stx), Typ-III-Sekretion , Intimin , LPS , <i>Mobile genetische Elemente</i> : Bacteriophagen (Toxine) Plasmide (EHEC-Hämolysin) LEE Pathogenitätsinsel (Invasion, Eisenaufnahme)	Syst. Absorption mit potentiell lebensbedrohlichen Komplikationen blutige/ unblutige Diarrhoe, Hämorrhagische Colitis (HC) , hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)
Enterotoxigene <i>E. coli</i> (ETEC)	extrazellulär, Anheftung an kleine schüsselförmige Enterozyten	Bildet hitzelabile, bzw. -stabile Enterotoxine LT und/oder STa und b CFA (colonization factor antigen), CS (Coli surface Antigen) PCF (putativer Kolonisationsfaktor)	wässrige Diarrhoe selbstlimitierend, oder mit schwerem Verlauf (ähnlich Cholera)
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	intrazelluläre Invasion in Kolonepithelzellen, Hauptvertreter <i>E. coli</i> und <i>Shigellen</i> , Lyse der Phagosomen, Wanderung in der Zelle mit Hilfe von Aktinfilamenten, Fähigkeit zur Endo- und Exozytose	Plasmid-kodiertes Typ III Sekretionssystem : Signaltransduktion, die u.a. zur Lyse endozytischer Vakuolen führt	Dysenterie (ähnlich Shigellose)

diffus adhärenente <i>E. coli</i> (DAEC)	extrazellulär, Signaltransduktion innerhalb kleiner schüsselförmiger Enterozyten	Adhäsion an Hep-2 Zell Monolayers 75% bilden F1845 Fimbrien , ein Fimbrien-Adhäsion, dieses benötigt DAF (delay accelerating factor) zum Schutz vor MHC	Diarrhoe
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	extrazellulär, Anheftung an kleine und große schüsselförmige Epithelien mittels eines Biofilms, häufig Sekretion des enterotoxisch aktiven Autotransporters Pet	veranlasst intrazelluläre Bildung von Zytotoxinen und Enterotoxinen (ShET1, Pic, EAST1, Pet) AAF -Aggregation adhärenter Fimbrien, bildet Shigella-Enterotoxin 1 (ShET1)	persistierende Diarrhoe (Entwicklungsländer)

ETEC können ebenfalls Durchfallerkrankungen bei Tieren auslösen.

Ein weiterer Pathotyp, so genannte *avian pathogenic E. coli* (APEC) ist verantwortlich für respiratorische Infektionen, Perikarditis und Sepsis bei Geflügel.

Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC)	extrazellulär, Urogenitaltrakt, Biofilmbildung	Typ-1-Fimbrien; α-Hämolyysin -> induziert u.a. die Bildung von IL-6 und IL-8 , LPS , Sekretion von Sat (Zytotoxin der Vakuolen)	Zystitis Akute Pyelonephritis
------------------------------------	--	--	-------------------------------------

1.3.1. Adhäsine

Adhäsine

E. coli Bakterien besitzen haarförmige Strukturen auf ihrer Zelloberfläche, welche als Fimbrien bezeichnet werden. Diese bestehen aus verschiedenen Proteinuntereinheiten und ermöglichen ihnen die Anheftung an die Wirtszellen. Nachfolgend werden die

bislang am besten untersuchtesten Adhäsintypen extraintestinal pathogener *E. coli* beschrieben:

1.3.2. Fimbrienadhäsine

Typ 1-Fimbrien

Typ 1-Fimbrien sind der am weitesten verbreitete Fimbrientyp bei *E. coli*. Sie bestehen aus verschiedenen Proteinuntereinheiten, wobei die größte Untereinheit vom FimA-Protein gebildet wird („major subunit“). Zu den sogenannten „minor subunits“ zählen die Proteine FimH, FimC, FimG und FimF. Das Gencluster umfasst insgesamt 9 Gene, zu denen u.a. die Regulatorgene *fimB* und *fimE*, sowie die Strukturgene *fimC*, *fimD* und *fimH* gehören. Letzteres kodiert für das eigentliche Adhäsin und trägt maßgeblich zur Anheftung der Bakterien an die verschiedenen Epithelien des Wirtsorganismus durch Erkennung des Rezeptors (Mannose-haltige Strukturen) auf Epithelzellen bei. Dieses lässt sich experimentell durch die Agglutination von Hefezellen nachweisen, welche durch die Anwesenheit von Mannose gehemmt werden kann (Johnson et al., 1991).

Aber auch die Anheftung an sekretorisches Immunglobulin A (IgA), Laminin, Tamm-Horsfall Proteine, sowie die Bindungen an die CD 11 und CD 18 Komplexe von Leukozyten und Makrophagen, ist möglich (Johnson, 1991).

Durch Mutationen im *fimH* Gen, kann die Affinität des FimH-Lektins für Mono-Mannosereste der uroepithelialen Rezeptoren beeinflusst werden, was mit dem Virulenzpotential von UPEC korreliert (Sokurenko et al., 1998, 2001).

P-Fimbrien

P-Fimbrien sind bei vielen uropathogenen *E.coli*-Isolaten zu finden, die beim Menschen Infektionen des oberen Urogenitaltraktes hervorrufen. P-Fimbrien binden über die Gal (α 1-4) Gal-spezifische Bindung an Glycolipid-Isorezeptoren und führen durch eine Entzündungsreaktion des Wirtes zur Schädigung des Epithels (Johnson et al., 2000).

P-Fimbrien werden durch das chromosomal lokalisierte und insgesamt 11 Gene umfassende *pap*-Gencluster (*papA-papK*) kodiert (Hacker, 1992).

Die Expression von P-Fimbrien erfolgt in weitaus weniger *E. coli*-Isolaten als die der Typ 1- Fimbrien (Van den Bosch et al., 1993).

S- und F1C-Fimbrien

Diese beiden Fimbrientypen gehören zur S-Fimbrien-Superfamilie (Khan et al., 2000). S-Fimbrien vermitteln eine Mannose-resistente Hämagglutination (MRHA) bei *E. coli*-Stämmen, die keine P-Fimbrien exprimieren. Die Rezeptorstrukturen sind terminale Sialyl-Galaktosid-Reste und kommen im menschlichen Körper auf den Epithelien von Glomeruli und sämtlichen Abschnitten des Tubulus, im Bindegewebe der Niere und auf den Endothelien von vielen Gefäßen, nicht nur im Urogenitaltrakt, vor. Es besteht eine Assoziation zwischen der Expression der S-Fimbrien und einzelnen Serotypen (Johnson, 1991).

S-Fimbrien-exprimierende Stämme können Harnwegsinfekte verursachen. Sie sind aber häufiger als Erreger bei Meningitiden und bakteriämischen und septischen Zuständen zu finden (Johnson, 1991). Ihre Rolle als Erreger von ZNS-Infektionen wird durch die Entdeckung plausibel, dass sie auch an Glykolipide im Gehirn adhären können (Prasadarao et al., 1993).

F1C-Fimbrien verursachen keine Hämagglutination. Die Rezeptorstruktur wurde kürzlich beschrieben und ist die Disaccharidsequenz Gal-NAc- β -(1-4)-Gal- β in Gangliosyl-Ceramid (Khan et al., 2000). Über diese wird eine Bindung von Bakterien an Zellen im proximalen Tubulus, von Blutgefäßen und der Muskulatur der Harnblase ermöglicht (Virkola et al., 1988). Dieser Fimbrientyp findet sich in ca. 14 % aller *E. coli*-Isolaten bei Harnwegsinfekten (Pere et al., 1985).

Curli

Curli sind dünne, filamentöse Strukturen, welche an der Zelloberfläche von *E. coli* Stämmen und *Salmonella* subsp. zu finden sind. Die Untereinheit (CsgA) bindet an extrazelluläre Matrix und Serumproteine, wie Laminin, Fibronectin, Plasminogen und Plasminogen aktivierende Proteine. Durch diese Fähigkeit sind sie auch in der Lage, an

die Proteinstrukturen des „major histocompatibility complex“ class I und II zu binden (Olsen et al., 1998). Das Operon setzt sich aus den Genen *csgAB* und *csgDEFG* zusammen. CsgD dient als Transkriptionsaktivator des *csgBAC* Operons. Die *csgEFG* Gene kodieren für Proteine, die wahrscheinlich für die Zusammenlagerung der CsgA-Untereinheiten verantwortlich sind. Die Beteiligung des *csgC* Gens an der Produktion von Curli wird vermutet. Auch das *crl* Gen trägt zur Entstehung der Curli bei, wobei die Transkription durch das CsgD Protein reguliert wird. Einige *E. coli* Stämme, wie z.B. die K-12 Stämme, besitzen das *csgD* Gen nicht und exprimieren somit keine Curli (Mühldorfer und Hacker, 1994; Mühldorfer et al, 2001).

1.3.3. Nicht-Fimbrien Adhäsine

In diese Gruppe werden alle Strukturen mit adhäsiven Eigenschaften eingeteilt, die nicht an Fimbrien gebunden sind. Sie vermitteln unter anderem die Bindung an die extrazelluläre Matrix bei Infektionen im Gewebe und bei Verletzungen (Finlay und Cossart 1997). Bei *E. coli* sind vor allem AfaD und AfaE von Bedeutung. Jouve und seine Mitarbeiter demonstrierten, dass die Interaktion zwischen *E. coli*, die entsprechende *afa*-Gencluster tragen, und HeLa-Zellen von AfaD- und AfaE-Proteinen vermittelt wird (Jouve et al. 1997).

Die *Afa*-Adhäsine werden von vielen diarrhoegenen und uropathogenen *E.coli* gebildet. Trotzdem sie als Nicht-Fimbrien-Adhäsine bezeichnet werden, besitzen sie eine feine fibrilläre Struktur, welche schwer zu erkennen ist (Keller et al. 2002).

Adhäsineigenschaften pathogener *E. coli* können ebenfalls Proteine besitzen, die in die äußere Membran integriert sind, zum Beispiel Intimin der EPEC und EHEC, oder andere Nicht-Fimbrien-Proteine. Manche Strukturen dienen als Trigger für eine weitere Signaltransduktion, welche innerhalb der Zelle zu Rearrangements und schließlich zur Zerstörung führen können. Hier sind zum Beispiel die Vertreter der Dr-Familie zu nennen, die von DAEC und UPEC exprimiert werden. Sie binden an den decay-acceleration-factor (DAF oder CD55), was wiederum zu einer Aktivierung der PI-3-Kinasen (anti-Apoptose) und Genexpression des MHCI-Komplexes führt. Bisher sind 10 Adhäsine der Dr-Familie beschrieben wurden (Tieng et al., 2002).

1.3.4. Eisenaufnahmesysteme

Allen mikrobiellen Erregern, einschließlich uropathogener Bakterien, ist die Notwendigkeit der Aufnahme von Eisen aus ihrer Umwelt gemein. Die geringe Konzentration an frei verfügbarem Eisen in den Körperflüssigkeiten der Wirte (10^{-9} mol/l), deckt bei weitem nicht den Bedarf (10^{-6} mol/l) für ein effektives Wachstum der Bakterien (Chipperfield und Ratledge, 2000). Infolgedessen haben pathogene Bakterien zwei Systeme entwickelt, mit deren Hilfe sie effektiv mit dem Wirtsorganismus um das lebensnotwendige Element Eisen konkurrieren können.

Über die Expression von Rezeptoren können Eisenkomplexe, wie Transferrin, Lactoferrin und Hämoglobin als Eisenquelle des Wirtes genutzt werden (Hanson et al., 1992). Auch die Synthese und Sezernierung von eisenbindenden Chelatoren wird zur Deckung des Eisenbedarfes genutzt. Diese als Siderophore bezeichneten Verbindungen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, die Katechole (z.B. Enterobaktin) und Hydroxamate (z.B. Aerobactin). Diese Siderophore sind in der Lage, Eisen aus bestehenden Komplexen im Wirtsorganismus zu lösen und für den eigenen Bedarf zu nutzen (Bagg und Neilands, 1987; Ratledge und Dover, 2000).

E. coli-Bakterien sind in der Lage ein Häminaufnahmesystem (Chu) sowie mehrere verschiedene Eisenaufnahmesysteme, wie z.B. das Fec-(Citrat) System (kodiert von *fecA*), Salmochelin (kodiert von *iroN-B*), Aerobaktin (kodiert von *iucA-D*), Enterochelin (kodiert von *entA-D*) und Yersiniabaktin (kodiert von der „high pathogenicity island“, HPI) zu bilden. Dabei wird unter anderem Aerobaktin von den extratestinalpathogenen Keimen produziert. Diese Eigenschaft sichert beispielsweise UPECs oder Sepsis verursachenden Stämmen, auch in extrem eisenarmen Medien, wie Serum wachsen zu können (Neilands, 1992). Aerobactin wird von den uropathogenen *E. coli* als Eisenaufnahmesystem genutzt. Die Kodierung erfolgt über ein Operon, das aus 5 Genen besteht. Für die Synthese von Aerobaktin sind vier der fünf Gene (*iron uptake chelator* = *iucA*, *iucB*, *iucC* und *iucD*) verantwortlich. Darüber hinaus kodiert das *iutA*-Gen für einen Membranrezeptor der äußeren Membran, an den die entsprechenden Aerobactin-Eisen-Komplexe binden (Janssen, 2002; Ewers et al., 2003). Das Operon liegt auf einem ca. 80 kb großen Plasmid, dem Colicin-V-Plasmid (ColV-Plasmid), kann allerdings auch chromosomal auf einer Pathogenitätsinsel lokalisiert sein. Nach der

Aufnahme wird das Eisen der Bakterienzelle eingebaut (Waters and Crosa 1991; Ewers et al., 2003; Tivendale et al., 2004).

1.3.5. Toxine

Pathogene *E. coli* sind in der Lage, verschiedene Toxine zu bilden:

α -Hämolysin:

Alpha-Hämolysin (α -Hly) ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor uropathogener *E. coli*. α -Hly kann neben einer direkten Zelllyse auch eine Reihe von sekundären Zellreaktionen auslösen. Das α -Hämolysin gehört zu der Rtx „repeats in toxin“-Toxinfamilie.

Das α -Hämolysin-Gencluster (*hlyCABD*) ist zu etwa 95 % Bestandteil des Bakterienchromosoms und in diesen Fällen innerhalb von PAIs lokalisiert. Die restlichen 5 % der *hlyCABD*-Determinanten sind bei *E. coli* auf Plasmiden lokalisiert.

Das *hly*-Gencluster ist häufig in der Nähe eines P-Fimbriengenclusters zu finden und kann durch Deletion eliminiert werden (Mühdorfer und Hacker, 1994). Die zwei *hly*-Gencluster des UPEC-Stammes 536 liegen zum Beispiel auf den Pathogenitätsinseln PAI I₅₃₆ und II₅₃₆.

Das *hly*-Gencluster kodiert für vier Proteine: dem eigentlichen Toxin HlyA, welches das HlyC-Protein für seine Aktivierung benötigt. HlyC überträgt Fettsäurereste auf eine bestimmte Acylierungsstelle des HlyA-Moleküls (Braun et al., 1993; Ludwig et al., 1996). Die Proteine HlyB (ABC-Transporter) und HlyD (ein „membrane fusion protein“) sind für den Transport von HlyA durch die Cytoplasma- und äußere Membran verantwortlich (Mühdorfer et al., 2001). Beteiligt ist hierbei zusätzlich das äußere Membranprotein TolC (Koronakis und Hughes, 1996).

Das HlyA-Protein verursacht Transmembranporen in der Zytoplasmamembran eukaryotischer Zellen und macht die doppelschichtige Lipidmembran durchlässig (Braun et al., 1993; Menestrina et al.; 1994).

Eine Domäne am C-Terminus von HlyA wird für die Ca²⁺ Bindung und die Interaktion mit der eukaryotischen Membran benötigt (Döbereiner et al., 1996).

Die Bezeichnung des alpha-Hämolytins bezieht sich hauptsächlich auf die Lyse von Erythrozyten, aber auch anderen Zellen wie zum Beispiel Epithelzellen und Leukozyten

(Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) werden lysiert. Letztere reagieren sogar sehr empfindlich auf die Anwesenheit niedriger Konzentrationen des Toxins, was über die Zellaktivierung zur Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren, wie Leukotrienen, Histamin und Serotonin führt. Humane Monozyten reagieren auf nanomolare Konzentrationen mit einem Verlust ihres ATP-Speichers und der damit verbundenen Lebensfähigkeit. Daneben wird die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) inhibiert (König et al., 1994).

Zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1 (CNF-1)

Einige UPEC sind in der Lage neben dem α -Hämolysin auch den zytotoxisch-nekrotisierenden Faktor 1 (CNF-1) zu bilden.

CNF-1 zeigt in Zellkulturen einen typischen zytopathischen Effekt (Caprioli et al., 1983).

CNF-1-positive Stämme werden mit großer Häufigkeit unter uropathogenen Stämmen und unter Bakteriämiekeimen aus Menschen und Tieren nachgewiesen. CNF-1 tritt dabei eng assoziiert mit α -Hämolysin auf. Die CNF-1-positiven Stämme wirken praktisch immer hämolysierend. Unter allen hämolysierenden Stämmen dagegen sind 60–70% CNF-1 positiv (Hilali et al., 2000). Das *cnf1*-Gen liegt häufig mit *hly*- und *pap*-Determinanten assoziiert auf dem Chromosom.

CNF-1 induziert über die Aktivierung des G-Proteins „Rho“ die Bildung von Aktin-Streßfasern (actin stress fibers), vermindert die Transmigrationsfähigkeit von polymorphkernigen Zellen durch intestinale Zellkulturen und führt zum Verlust an Mikrovilli. Das 21-kDa Rho-Protein wird hierbei posttranslational modifiziert, indem eine Deamidierung am Gln63 des Rho-Proteins und weiterer Actin-regulierender kleiner GTPasen wie Rac (Lammelipodien) und Cdc42 (Filopodien), stattfindet (Horiguchi, 2001). Das gebundene GTP kann nicht mehr gespalten werden, was zu einer Daueraktivierung der GTPase führt, die an der Regulation der mikrofilamentären Stressfasern beteiligt ist (Fiorentini et al., 1997; Schmidt et al., 1997).

CNF-1 besteht aus drei Domänen. Die N-terminale Domäne dient als Ligand und bindet mit hoher Affinität an einen Zellrezeptor. Die mittlere Domäne vermittelt über zwei hydrophobe Helices die Aufnahme des Toxins durch Endozytose in die Zelle. Das C-terminale Ende ist verantwortlich für die eigentliche Toxinwirkung. Es verhindert durch

Modifikation des Proteins die Hydrolyse von GTP und verursacht die Daueraktivierung der GTPase (Boquet, 2001). CNF sowie auch DNT sind beteiligt als Trigger für die G1/S-Transition während des Zellzyklus und der DNA-Replikation in verschiedenen Mammalierzellen, wie Swiss 3T3 Fibroblasten und MC3T3-E1 Osteoblasten. Diese Beeinflussung des Zellzyklus durch CNF und DNT inhibiert die Zelldifferenzierung (Horiguchi, Nakai and Kume, 1991). Weitere Untersuchungen zeigen, dass CNF einen antiapoptotischen Effekt durch eine Anregung zur Proteinexpression der Bcl-2-Familie hat (Fiorentini et al, 1998). Die Rho-GTPasen regulieren ferner die Expression des Cyclins D1, das wiederum die CDK Inhibitoren p27 Kip1 und p21 CIP1 und damit den Zellzyklusarrest bzw. Seneszenz auslösen kann (Coleman et al., 2004).

Mills und Mitarbeiter beschrieben im Jahre 2000 die dermonekrotische Wirkung von CNF-1. Außerdem steigert CNF-1 den „oxidative burst“ in Phagozyten, hemmt aber gleichzeitig die Phagozytose der Bakterien durch eben diese Zellen (Hofman et al., 2000).

1.3.6. Kapseln

Kapseln sind ein bedeutendes Merkmal aller uropathogenen *E. coli*. Sie bestehen aus extrazellulären Polysacchariden, die nicht Bestandteil der äußeren Membran sind. Für *E. coli* sind gegenwärtig mehr als 100 Varianten der Kapselpolysaccharide bekannt, welche in 2 Gruppen (I und II) unterschieden werden. Die Gruppe II wird zusätzlich noch in Subgruppen II und III weiter unterteilt.

Man differenziert die Kapseltypen nach ihrer biochemischen Zusammensetzung und der Organisation ihrer Gencluster (Russo et al., 1998; Ewers et al., 2003). Die chromosomal lokalisierten Gruppe I-Kapselgencluster liegen in der Nähe der *his*-Gene, die der Gruppe II-Kapseln hingegen nahe der *ser*-Gene. UPEC produzieren vor allem Kapseln des Types K1, K2, K5, K6, K12, K13, K29 und K51 (Johnson, 1991; Jann und Jann, 1992).

Kapseln erhöhen die Virulenz der Bakterien, indem sie mittels Antigen-Mimikry, also dem Nachahmen der wirtsähnlichen Struktur, einer gezielten Immunantwort entgehen. Des Weiteren sind in manchen Fällen Kapseln an der Serumresistenz beteiligt, da eine Opsonierung der Bakterienzelle nicht stattfindet (Mühldorfer et al., 2001).

UPEC produzieren hauptsächlich Kapseln der Gruppe II. Diese haben folgende Eigenschaften: sie sind dünn, sauer, anionisch, thermostabil und bilden eine unregelmäßige Oberfläche (Johnson, 1991).

Die K1-Kapsel wird in 80 % der untersuchten Fälle bei durch *E. coli* induzierter Neugeborenen-Meningitis gefunden. Auch bei der Mehrheit an Sepsis oder akuter Pyelonephritis erkrankter Kinder wurden K1-Kapseln nachgewiesen (Robbins et al., 1974). Häufig werden Kapseln nur in bestimmter Assoziation mit anderen Pathogenitätsfaktoren exprimiert, wie z.B. die K1-Kapsel mit Antigenen der O-Gruppe O1, O2, O18 und P-Fimbrien. Die K5-Kapsel wurde auch zusammen mit dem α -Hämolysin nachgewiesen (Johnson, 1991).

Der Kapseltyp K1 soll im Folgenden als modellhaftes Beispiel beschrieben werden: Die K1-Kapsel besteht aus einer Wiederfolge von α -2,8 verknüpften Sialinsäureresten (N-Acetyl-Neuraminsäure = NeuNAc). Ihre reduzierten Enden sind über Esterbrücken mit Phosphorsäuremolekülen verbunden. Sie dienen dem Molekül als Membrananker und machen die Oberfläche negativ. Die Komplementaktivierung kann somit verhindert werden. Der Aufbau der K1-Kapsel ähnelt dem der Polysialinsäure. Sie ist Bestandteil des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (N-CAM) in der embryonalen Entwicklung von Wirbeltieren. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Ähnlichkeit für geringe Immunität verantwortlich ist (Jann und Jann, 1992; Mühldorfer et al., 2001).

Die Synthese und Expression der K1-Kapsel wird durch das 17-kb große *kps*-Gencluster kodiert. Die Unterteilung erfolgt nach der Funktion in 3 Regionen. Region 1 besteht aus sechs Genen (*kpsFEDUCS*). Zusammen mit der Region 3 (*kpsMT*) wird der Transport der Sialinsäuremoleküle vom Cytoplasma zur äußeren Membran ermöglicht (Russo et al., 1998). Diese Region ist für alle Gruppe II-Kapseldeterminanten konserviert auf dem Chromosom. Die Gene der Region 2 kodieren für die Zuckerzusammensetzung und sind Kapseltyp-spezifisch (Annunziato et al., 1995; Daines et al., 2000).

Pourbakhsh et al. (1997a) konnten zeigen, dass drei APEC-Stämme, die das K1-Kapselantigen exprimierten, deutlich resistenter gegen den bakteriziden Effekt des Serums (Komplement) waren als APEC-Stämme, die verschiedene andere K-Kapselantigene aufwiesen. Eine K1 Kapsel-negative Mutante wurde sensitiv gegen die bakterizide Wirkung des Komplements und verlor ihre Pathogenität in verschiedenen experimentellen Infektions-Tiermodellen. In späteren Arbeiten wurde nachgewiesen,

dass eine spontane K1-Mutante des APEC-Stammes MT78 ein vermindertes Kolonisationspotential im Hühner-Infektionsmodell aufwies. Im Hühnerserum konnte die K1-Kapsel als Ursache für eine erhöhte Resistenz gegen dessen bakteriziden Effekt und Phagozytose nach Opsonisierung mit Komplementfaktor festgestellt werden (Mellata et al., 2003a; Mellata et al., 2003b).

1.3.7. Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide sind ein charakteristischer Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und setzen sich aus der Lipid A-Komponente, dem Kern-Polysaccharid und der O-spezifischen Polysaccharidseitenkette zusammen (Raetz und Whitfield, 2002). Das *rfa*-Gencluster kodiert für Enzyme, die für die Synthese des Kernpolysaccharides verantwortlich sind. Die *rfb*-Gene hingegen sind zuständig für die Enzyme, die zur Bildung der O-spezifischen Seitenketten bzw. „repeating units“, aus denen die O-spezifischen Seitenketten zusammengesetzt sind, führen. Die Kontrolle der Genexpression erfolgt über die *rfc*-Gene (Mühldorfer et al., 2001). Das Lipid A verankert das LPS-Molekül durch hydrophobe und elektrostatisch-ionogene Wechselwirkungen in der Phospholipid-doppelschicht der äußeren Membran. Die damit entstehenden chemischen Barrieren bieten hierdurch einen gewissen Schutz vor äußeren Einflüssen. So können z.B. einige Detergentien, Antibiotika, Gallensalze oder Lysozym nicht eindringen. Während der Zellyse von Bakterien werden Lipopolysaccharide freigesetzt. Das Lipid A erweist sich dabei in isolierter Form als äußerst toxisch. Es wird deshalb auch als Endotoxin von *E. coli* bezeichnet (Rietschel und Westphal, 1999). Das Lipid A von *E. coli* ist dem der meisten Gram-negativen Bakterien sehr ähnlich. Dem Lipid A folgt das aus fünf basalen Zuckern bestehende Kern-Polysaccharid, das in innere (die Lipid A-proximale-) und äußere Region (die Lipid A-distale Region) unterteilt ist. Die innere Kernregion ist konserviert und bei allen *Enterobacteriaceae*, wie Salmonellen und *E. coli* nahezu identisch. Sie besteht aus 2-Keto-3-desoxy-Octonsäure (KDO), Heptosen und Ethanolamin (Vaara, 1999; Ewers et al., 2003). Die äußere Kernregion hingegen ist variabel und liegt in den Formen R1, R2, R3, R4 und K-12 vor. Sie wird charakterisiert durch die Komponenten Glukose, Galaktose und N-Acetylderivaten dieser Verbindungen. Die Variabilität ergibt sich aus der Anzahl Komponenten und der Art ihrer Verknüpfung. Die R1-Form wird hauptsächlich bei

extraintestinalen *E. coli*-Isolaten gefunden, die R3-Form vorrangig bei intestinalen *E. coli*-Stämmen (Currie und Poxton, 1999). Die R1-Form kommt in der äußeren Kernregion bei *E. coli* am häufigsten vor, gefolgt von den Formen R2, R3, R4 und K-12 (Amor et al., 2000). Die sich der distalen Lipid A-Region anschließenden Oligopolysaccharidketten unterliegen in ihrer Struktur und Zusammensetzung ebenfalls starken Variationen. Sie werden als O-spezifische Seitenkette oder O-Antigen bezeichnet und sind ausschlaggebend für die strukturelle Vielfalt der verschiedenen Serotypen und letztlich die große Biodiversität des LPS-Moleküls. Außerdem interagieren sie mit ihrer Umgebung sowie dem Immunsystem des Wirtsorganismus (Ewers et al., 2003). Die äußere Kernregion besteht bei *E. coli* aus 10 bis 18 sich wiederholenden Einheiten (engl.: repeating unit), die aus Polysacchariden mit möglichen Modifikationen, z.B. O-Acetylierung und Einbau von Sialinsäure oder Aminosäuren aufgebaut sind. Inzwischen sind für *E. coli* 181 verschiedene O-Antigene bekannt (*E. coli*-Serotypen), die auch bei Bakterien verschiedener Spezies identisch sein können, z.B. *Salmonella* O34 und *E. coli* O157 (Ørskov et al., 1984, Rice et al., 1992, Shimada et al., 1992, Scheutzel et al., 2004, Khan et al., 2003).

Die unterschiedliche Länge der O-Seitenketten können die Bakterien als raue (rough) oder glatte (smooth) Kolonien wachsen lassen. Raue Kolonien haben die Fähigkeit verloren, lange O-spezifische Seitenketten oder Teile des Kernpolysaccharides zu synthetisieren. Sie werden als so genannte Verlust-Mutanten angesprochen, da sie nicht in der Lage sind, in den Abwehrmechanismus des Komplementsystems einzugreifen. Sie sind serumsensitiv (Heinrichs et al., 1998). Glatte Formen weisen langkettige O-Seitenketten auf und sind hingegen grundsätzlich serumresistent. Sie wirken über die Hemmung der Aktivierung von Komplement im Komplementsystem und inhibieren gleichzeitig die Rezeptor-vermittelte Phagozytose durch Makrophagen, durch die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1 und IL-6 und TNF α (Ewers et al., 2003).

Das LPS von *E. coli* und anderer Gram-negativer Bakterien bindet an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). Die auf diese Weise ausgelöste Zytokinkaskade ist Ursache für den septischen Schock, der mit hoher Wahrscheinlichkeit lethal verlaufen kann. Endotoxin als ein lokaler Mediator induziert eine Reihe verschiedener pathophysiologischer Immunreaktionen, die abhängig von der Dosis sind und Auswirkungen zeigen, die von der Aktivierung akuter-Phase-Proteine bis hin zu einem septischen Schock reichen

(Lohuis, 1988). Viele Studien bestätigten die Annahme, dass pathogene *E. coli* infizierter Brustdrüsen oft assoziiert mit LPS-Wirkung sind. Dabei scheint LPS eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Mastitis zu spielen (Carroll et al., 1964).

Die Infektion durch extraintestinal pathogene *E. coli* außerhalb des Darmes ist aufgrund des Spektrums an verschiedenen Pathogenitätsfaktoren und der Variabilität an genetischer Neukombination möglich. Somit kann sich eine harmlose Infektion des Gastrointestinaltrakts zu einer schwerwiegenden akuten Mastitis entwickeln, ausgelöst durch ursprünglich aus dem Darm stammende *E. coli*.

1.3.8. Coliforme Mastitis bei Rindern

Tierhaltungsfaktoren (management factors)

Die Immunabwehr einer weiblichen Kuh wird in der späteren Tragezeit durch Tierhaltungsfaktoren (management factors) beeinflussen. Die Produktion von Milch schwächt das Immunsystem der Kühe und führt zu einer verminderten Abwehr und Stresstoleranz. Hochproduzierende Kühe zeigen deutlich höhere Sensitivität gegenüber coliformen Infektionen. Die regelmäßige Kontrolle von Milch, besonders in Europa, ergab, dass es womöglich einen Schutz des Euters vor pathogenen Erregern durch „somatic cell count“ (SCC) gibt (Suriyasatharpon, Heuer, Noordhuizen-Stassen and Schukken, 2000). Diese Ergebnisse werden durch epidemiologische Untersuchungen und noch relativ wenige experimentelle Daten gestützt (Shuster, Lee and Kehrli, 1996). Die Untersuchungen zeigen die Tendenz, dass Milch mit wenig enthaltenem SCC eine Prävention der Kühe vor einer Infektion durch pathogene Erreger darstellt (Suriyasatharpon et al., 2000).

Immunabwehr der Rinder (cow factors)

Alle bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Schwere einer möglichen coliformen Mastitis bei Rindern, insbesondere der klinische Verlauf und das Ergebnis der Infektion hauptsächlich vom jeweiligen Status des Immunsystems der infizierten Milchkuh abhängt. Damit ergibt sich ein komplexer Zusammenhang, in dem das Alter, der futterabhängige Energiestatus, die Bildung von pro- und anti-inflammatorischen

endogenen Faktoren und die Aktivierung der Immunzellen eine entscheidende Rolle spielen. Insbesondere die letztgenannten Faktoren, die Entzündungsreaktion und Reaktion der professionellen phagozytären Immunzellen als unspezifische Abwehr unterliegen einer konstitutiven Balance mit dem Wachstum pathogener *E. coli* und deren Produktion von Virulenzfaktoren (Suriyasatharpon et al., 2000; Paape, et al., 1996; Kehrli, Harp, 2001; Sordillo, Streicher, 2002)

Die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten pathogene Erreger zu vernichten, ist der kritische Schritt in der Abwehrreaktion gegen *E. coli* und entscheidend für die Beseitigung der Infektion (Autosterilisation). Seit 1990 wurden Untersuchungen zum Mechanismus der neutrophilen Abwehr bei akuter Mastitis von Milchkühen veröffentlicht (Burvenich et al., 1994, 1995, 1999, Paape et al., 1991, 2000). Besonders klare Ergebnisse ergaben sich bei der Analyse des Immunmechanismus der Brustdrüse. Neutrophile Granulozyten sind die wichtigsten Abwehrzellen zum Schutz des Kuheuters im Falle einer Mastitis. Dabei wandern die Neutrophilen in das Lumen des Euters, wodurch eine effektive Abwehrreaktion stattfinden kann. Offenbar ist wichtig, dass die pathogenen *E. coli* und von ihnen produzierte Toxine eine minimale Gewebeerstörung verursachen. Erst diese führt zu einer voll ausgeprägten Abwehrreaktion. Insbesondere hängt die endgültigen Beseitigung der Erreger und damit das Ergebnis der Infektion von der Beteiligung der Makrophagen ab, welche die Neutrophilen im Fortschreiten der Abwehrreaktion ersetzen (Paape et al., 2002).

1.4. Aufgabenstellung

Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist es, eine molekulare epidemiologische Analyse an *E. coli*-Stämmen vorzunehmen, die von Fällen akuter klinischer oder chronischer Mastitis bei Milchkühen gewonnen wurden. Es sollen insgesamt 42 Virulenzfaktoren in 222 Isolaten geprüft werden. Mit Hilfe der Multiplex-PCR sollte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Stämme die entsprechenden Virulenzfaktor-Gene in ihrem Genom integriert haben. Die in dieser Arbeit vorgesehene molekulare Analyse zielte darauf, zunächst eine qualitative Aussage über das pathogene Potential auf der genetischen Ebene des Erregers *E. coli* zu treffen. Die Bestimmung der im Genom der Erreger vorhandenen Virulenzfaktor-Gene würde bei Vorliegen einer großen Zahl von Mastitis-assoziierten Isolaten darüber hinaus eine quantitative Aussage erlauben. Es wird davon ausgegangen, dass in vielen Stämmen vorkommende Gene, die Virulenzfaktoren kodieren, eine Funktion im pathogenen Mechanismus der Mastitis haben. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass nicht oder nur in einer geringen Zahl der Stämme vorkommende Virulenzfaktoren wahrscheinlich in der Ausprägung der Infektion keine oder eine untergeordnete Rolle spielen. Der in dieser Arbeit vorgenommene methodische Ansatz soll also im Falle einer positiven Korrelation *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren vs. Rindermastitis einen Ansatz dafür liefern, spezifische Faktoren zu identifizieren. Die alleinige durchschnittliche Auswertung des Vorkommens der einzelnen Virulenzfaktoren liefert nur relativ unsichere Indizien für ihre Funktion. Deshalb sollen in dieser Arbeit die Frequenzen von Kombinationen verschiedener Faktoren berücksichtigt werden. Diese differenziertere Auswertung soll ermöglichen, die Sicherheit der Ergebnisse zu erhöhen. Erreicht werden soll dieses Ziel insbesondere durch die quantitative Auswertung des Vorkommens von Einzelfaktoren bzw. Kombinationen von wenigen Faktoren. Dieses Verfahren sollte die Wahrscheinlichkeit deutlich erhöhen, funktionell wichtige Virulenzfaktoren herauszufinden. Insbesondere wären Aussagen möglich, ob z. B. eine „Grundausstattung“ von Faktoren ausreichend ist, um eine Mastitis bei Milchkühen auszulösen oder ob in der Regel mehrere Faktoren zusammenwirken müssen.

Auch dieser erweiterte Ansatz liefert nur verbesserte Korrelationen, die eine molekulare Untersuchung der Rolle der einzelnen Faktoren im Pathogenitätsmechanismus nicht ersetzen kann. Aus der genetischen Analyse sind Schlüsse auf die tatsächliche

quantitative Expression der untersuchten Pathogenitätsfaktoren unter den Bedingungen des Erregerwachstums in Brustdrüsengewebe der Milchkühe nicht möglich. Sie würden aufwendige histologische und Serum-Analysen erfordern, die systematisch über den gesamten Zeitraum einer Mastitisepisode vorgenommen werden müssten und auch die Wirtsfaktoren (Abwehrreaktionen) einschließen sollten. Entscheidend für die Mastitis ist mit Sicherheit die erwähnte limitierte Gewebszerstörung und die damit verbundene Invasivität der *E. coli*, d. h. neben der qualitativen und quantitativen Bildung der Pathogenitätsfaktoren ist die Lokalisation der Expression im Gewebe zu berücksichtigen.

Trotz dieser Einschränkungen wird davon ausgegangen, dass breit gefächerte molekulare epidemiologische Analysen, die dank der Multiplex-Technologie möglich geworden sind, wertvolle Anhaltspunkte liefern können zur Beurteilung des Infektionsgeschehens. Die in dieser Arbeit geplante umfangreiche Untersuchung soll eine differenzierte genetische Auswertung gestatten, die die Zuverlässigkeit deutlich verbessert, Mastitis-assoziierte Virulenzfaktoren bei *E. coli*-Erregern zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Die benötigten Chemikalien für diese Arbeit wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Sigma-ARK (München), Roth (Karlsruhe), Merck (Haar), Difco, Oxoid (Kansas City, Missouri, USA), Serva (Taunusstein), Invitrogen (Karlsruhe), MBI-Fermentas (Heidelberg), New England Biolabs (Frankfurt am Main), GE Healthcare (Freiburg), Qiagen (Hilden), Biorad (München), MWG-Biotech (Ebersberg) und Eurobio (Les Ulis Cedex B, Paris) bezogen und gemäß den Bestimmungen der Hersteller verwendet.

2.2. Nähr – und Selektivmedien

Lysogeny Broth (LB) Agarplatten:

10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
16 g Agar
ad 1 l H₂O dest.

LB-Flüssigmedium:

10 g Pepton aus Casein
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
3 g Agar
ad 1 l H₂O

Mac Conkey-Agarplatten:

50 g Fertigpulver (Difco)
ad 1 l H₂O dest.

Blutagarplatten:

LB-Agarplatten

3% gewaschenes Rinderblut

Die aufgeführten Komponenten wurden abgewogen, durch kräftiges Schütteln in destilliertem Wasser gelöst und danach 20 Minuten autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden ggf. Blut und andere Zusätze, (s.o.) dazugemischt. Für die Herstellung von Agarplatten werden ungefähr 20 ml des Gemisches unter der sterilen Werkbank in sterile Petrischalen gegossen und ca. 20 min getrocknet. Die nicht sofort verwendeten Platten können begrenzte Zeit im Kühlraum in einer Plastikverpackung gelagert werden. LB-Flüssigmedium kann in einer sterilen Flasche aufbewahrt und bei steriler Benutzung mehrfach wieder verwendet werden.

2.3. Bakterienstämme

Folgende *E. coli* Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tab. 4: verwendete Bakterienstämme

Stamm	Bezeichnung	Herkunft
1755-1796	klin. Mastitis	L. Wieler
1797-1852	klin. Mastitis	L. Wieler
907-1853	klin. Mastitis	L. Wieler
1854-1265	klin. Mastitis	W. Petzl

2.4. Puffer für die verschiedenen Gelelektrophoresen

TAE-Puffer für Agarosegelelektrophorese

50fache-Stammlösung:

242 g Tris-(hydroxyethyl)-aminoethan

57,1 ml Essigsäure

100 ml 0,5-fach EDTA, pH 8

ad 1 l H₂O dest.

Stop-Puffer

25mg 0,25 % Bromphenolblau

25mg 0,25 % Xylencyanol

2,5g 25% Ficoll (Type 400)

ad 10 ml H₂O dest.

2.5. Verwendete Primerpaare

Tab. 5: Primer der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

Pools	Gene	Primer Name	Größe (bp)	Kontrolle	Primersequenzen (5'-3')
Pool -1	PAI	<i>RPAi f/r</i>	930	J96 + U5	ggacatcctgttacagcgcgca tcgccaccaatcacagccgaac
Pool -1	<i>papAH</i>	<i>pap AH f/r</i>	720	J96 + U5	atggcagtgggtgtcttttggtg cgtcccaccatacgtgtctcttc
Pool -1	<i>fimH</i>	<i>Fim H f/r</i>	508	J96 + U5	tgcagaacggataagccgtgg gcagtcacctgcctccggta
Pool -1	<i>kpsMT III</i>	<i>kpsMT III f/r</i>	392	J96	tcctcttgctactattcccct aggcgtatccatccctcctaac
Pool -1	<i>papEF</i>	<i>pap EF</i>	336	J96 + U5	gcaacagcaacgctggtgtcatcat

		<i>f/r</i>			agagagagccactcttatacggaca
Pool -1	<i>ibeA</i>	<i>ibe A f/r</i>	170	U5	aggcaggtgtcgccgcgtac tgggtctccggcaaaccatgc
Pool -2	<i>fyuA</i>	<i>fyuA f/r</i>	880	J96+V15+IA2 +PM9	tgattaaccccgcgacgggaa cgcagtaggcacgatgttgta
Pool -2	<i>bmaE</i>	<i>bmaE f/r</i>	507	PM9	atggcgctaacttgccatgctg agggggacatatagcccccttc
Pool -2	<i>sfa/</i> <i>focDE</i>	<i>sfa1 /</i> <i>sfa2</i>	410	J96+IA2	ctccggagaactgggtgcatcttac cggaggagtaattacaaacctggca
Pool -2	<i>iutA</i>	<i>aerJ f/r</i>	300	V15+IA2+PM 9	ggctggacatcatgggaactgg cgtcgggaacgggtagaatcg
Pool -2	<i>papG</i> <i>Allel III</i>	<i>papG</i> <i>Allel III</i> <i>f/r</i>	258	J96	ggcctgcaatggattacctgg ccaccaaatgacctgcccagac
Pool -2	<i>kpsMT K1</i>	<i>K1-f/</i> <i>kpsII r</i>	153	V15+IA2	tagcaaacgttctattggtgc catccagagataagcatgagca
Pool -3	<i>hlyA</i>	<i>hly f/r</i>	1.177	J96	aacaaggataagcactctgttctggt accatataagcggtcattcccgtca
Pool -3	<i>rfc</i>	<i>rfc f/r</i>	788	J96	atccatcaggaggggactgga aaccataccaaccaatgagcg
Pool -3	<i>nfaE</i>	<i>nfaE f/r</i>	559	P678	gcttactgattctgggatgga cgggtggccgagtcgatgcca
Pool -3	<i>papG</i> <i>Allel I</i>	<i>papG</i> <i>Allel I f/r</i>	461	J96	tcgtgctcaggtccggaattt tggcatcccccaacattatcg
Pool -3	<i>kpsMT II</i>	<i>kpsII f/r</i>	272	V27	gcgcatttgetgatactgttg catccagacgataagcatgagca
Pool -3	<i>papC</i>	<i>papC f/r</i>	200	J96+V27	gtggcagtatgagtaatgaccgta atataccttctgcagggatgaata
Pool -4	<i>gafD</i>	<i>gafD f/r</i>	952	PM9	tgttggaccgtctcagggtctc ctcccggaaactcgtgttact
Pool -4	<i>cvaC</i>	<i>CoIV-</i> <i>Cf/CoIV</i>	680	V15	cacacacaacgggagctgtt cttcccgcagcatagttccat

		<i>f/r</i>			
Pool -4	<i>cdtB</i>	<i>cdt- a1/cdt- a2 & cdt-s1/ cdt-s2</i>	430	V27	aaatcaccaagaatcatccagtta aaatctcctgcaatcatccagtta gaaagtaaatggaatataaatgtccg gaaaataaatggaacacacatgtccg
Pool -4	<i>focG</i>	<i>focG f/r</i>	360	J96	cagcacaggcagtgatacga gaatgtcgctgccattgct
Pool -4	<i>traT</i>	<i>traT f/r</i>	290	V15	gggtggtgcatgagcacag cacggttcagccatccctgag
Pool -4	<i>papG</i> Allel II	<i>papG f/r</i> Allel II <i>f/r</i>	190	P42, J96	gggatgagcgggccttgat cgggcccccaagtaactg
Pool -5	<i>papG I</i>	<i>pGf / pG</i> <i>l"r</i>	1.190	J96	ctgtaattacggaagtgattctg tccagaaatagctcatgtaaccg
Pool -5	<i>papG</i> II,III	<i>pGf /</i> <i>pGr</i>	1.070	P42	ctgtaattacggaagtgattctg actatccggctccggataaacat
Pool -5	<i>afa/draB</i> <i>C</i>	<i>afa f/r</i>	559	U8	ggcagagggccggcaacagge cccgtaacgcgccagcatctc
Pool -5	<i>cnf1</i>	<i>cnf1 /</i> <i>cnf2</i>	498	J96	aagatggagtttctatgcaggag cattcagagtctgcctcattatt
Pool -5	<i>sfaS</i>	<i>sfaS f/r</i>	240	J96, U8	gtggatacgcgattactgtg ccgccagattccctgattc
Pool -5	<i>kpsMT K5</i>	<i>K5-f /</i> <i>kpsII-r</i>	159	RZ451/P42	cagtatcagcaatcgttctgta catccagacgataagcatgagca

2.6. Stammhaltung und Anzucht der Bakterien

Die Bakterienstämme wurden in einem Gemisch aus LB-Medium und 20 % Glycerin bei -20 °C gelagert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt über Nacht in LB-Flüssigmedium (ÜN-Kultur) oder auf LB-Agar-Platten bei 37 °C.

2.7. Phänotypische Tests

α -Hämolysetest

Rinderblut wurde mit zweimal 30 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung vorsichtig gemischt und bei max. 5000 Upm 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und danach auf 30 ml aufgefüllt. Das gewaschene Rinderblut wurde dem autoklavierten und temperierten Agar hinzugefügt, unter der sterilen Werkbank in Agarplatten gegossen und getrocknet. Danach konnten die Bakterien streifenförmig auf die Platte aufgeimpft werden, zusammen mit der Negativkontrolle (*E. coli* K-12 – Stamm MG1655) und anschließend bei 37° C über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurde ein heller Hämolyseshof um die Bakterienstämme beobachtet, welcher durch das Toxin α -Hämolysin gebildet wurde.

2.8. Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR können beliebige DNA-Fragmente spezifisch in gewünschter Anzahl amplifiziert werden. Durch mehrere Zyklen bestehend aus den 3 Schritten

1. Denaturierung
2. Primer-Annealing und
3. Kettenverlängerung

erfolgt die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes.

Die Verwendung einer Multiplex-PCR ermöglicht es, pro Ansatz mehrere verschiedene DNA-Fragmente zu amplifizieren.

Die Template-DNA wurde folgendermaßen gewonnen:

Zuerst wurde der zu prüfende Bakterienstamm in 500 μ l H₂O_{bidest.} suspendiert und anschließend 10 Min. bei 100 ° C aufgekocht.

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis, wie in der nachfolgenden Darstellung zu sehen ist, zusammenpipettiert

Tab. 6: Promega-Taq-Polymerasen- Reaktionsansatz

Promega Taq Polymerase	μl
5x Green Go Taq Flexi Puffer	4
10mM dNTP-Gemisch	0,4
25 mM MgCl_2	2,4
Primergemisch	0,5
Template DNA	1
Go-Taq-DNA-Polymerase (5)	0,2
Destilliertes Wasser	11,5

Die Amplifizierung erfolgte über 35 Zyklen unter den jeweils optimalen Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung bei 95 ° C für 3 Minuten (Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge)

2. Denaturierung bei 94 ° C für 30 Sekunden (vollständige Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge)

3. Annealing bei 62,5 ° C für 1 Minute (Hybridisierung des Primers mit der einzelsträngigen DNA, die Temperatur ist abhängig von der Länge und GC-Gehalt der Primer)

4. Kettenverlängerung bei 72 ° C -> für 2,5 Minuten (die Taq-Polymerase verlängert den Primer komplementär zur Template-DNA am 3'-OH-Ende mit dNTPs)

5. Finale Kettenverlängerung bei 72 ° C für 5 Minuten (vollständige Synthese aller DNA-Fragmente.

Anschließend wurde ein Teil des Ansatzes (7,5 μl) mit einem Stop-Puffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Fragmente können durch die Agarosegelelektrophorese gemäß ihrer unterschiedlichen Länge aufgetrennt werden. Sie sind negativ geladen und wandern somit von der Kathode zur Anode.

Dabei wandern die kleinen Fragmente schneller durch die Agarose als größere. Entstandene PCR-Produkte können aufgrund ihrer Laufeigenschaften nach der Elektrophorese mittels der entsprechenden Positivkontrollen identifiziert werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt ebenfalls von der angelegten Feldspannung, die hier zwischen 70 und 90 V gewählt wurde, ab. Außerdem hat die Konzentration des

Agarosegels einen Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit der PCR-Produkte. In dieser Versuchsreihe wurde ein 2%-iges Gel verwendet.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde Laufpuffer in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in eine Gelform gegossen und anschließend mit mehreren Kämmen versehen, welche nach vollständiger Erstarrung des Agarosegels wieder entfernt wurden. Das Gel wurde nun in eine Gelelektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Laufpuffer überschichtet. In die erste und letzte Tasche wurde ein DNA-Größenmarker gegeben, danach wurden die jeweiligen Kontroll-PCR-Produkte am Anfang und Ende aufgetragen und anschließend die Proben, die vorher mit einem Stop-Puffer versehen wurden, in die Taschen gegeben. Die Laufzeit des Agarosegelelektrophorese betrug etwa 2 bis 3 Stunden.

Die Darstellung der DNA-Banden im Gel unter UV-Licht wird durch das Färben des Gels in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5µg/ml) für etwa 15 Minuten gestattet. Nach der Interkalierung des EtBr in DNA-Doppelstränge konnten diese durch Fluoreszenz detektiert und fotografisch dargestellt werden.

Isolierung chromosomaler DNA

Es wurde eine Übernachtskultur der Bakterien hergestellt, von der am nächsten Tag 2 ml in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge) zentrifugiert wurden. Das sedimentierte Bakterienpellet wurde mit 1 ml TNE-Puffer gewaschen zentrifugiert und in 540 µl TNEX-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Suspension mit 30 µl Lysozym (5 mg/ml, frisch eingewogen oder auch vorher gemischt und eingefroren) versetzt und 20 bis 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden 30 µl Proteinase K hinzugefügt (20 mg/ml) und die Suspension bei 65 °C 1 bis 2 Stunden im Wasserbad inkubiert, bis die Lösung lysiert war. Zur Ausfällung der DNA wurden die Proben mit 30 µl 5 M NaCl und 1 ml 96 %-igem eisgekühlten Alkohol versetzt und einige Minuten geschwenkt. War der DNA-Faden sichtbar präzipitiert, konnten die Proben ca. 20 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet zweimal in 70 %-igen Alkohol gewaschen und danach 20 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100 µl H₂O aufgenommen. Bei einer Wellenlänge von

260 nm konnte die OD bestimmt und die DNA auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl eingestellt werden.

2.9. Southern Blot-Hybridisierung

Hybridisierung mit dem ECL-System (nicht-radioaktive Hybridisierung nach Whitehead et al., 1983)

Der Southern Blot ist eine Methode, um bestimmte DNA-Fragmente, die mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu übertragen und dort durch Hybridisierung mit einer entsprechenden Sonde nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde die Methode der nicht-radioaktiven Detektion mittels Meerrettich-Peroxidase verwendet. Hierbei geht das positiv geladene Enzym Meerrettich-Peroxidase eine kovalente Bindung mit der negativ geladenen DNA ein. Diese setzt das den Entwicklerlösungen zugegebene H₂O₂ zu Sauerstoff und Wasser um. Der nun freigesetzte Sauerstoff oxidiert das in der Entwicklerlösung 2 enthaltene Luminol, was zur Aussendung eines Lichtsignals führt, welches dann auf einem Licht-sensitiven Film nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurde die DNA in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Durch das Färben mit Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Vor der Übertragung auf eine Nylonmembran wurde das Gel zunächst zweimal für 20 Minuten in Denaturierungslösung und anschließend für 20 Minuten in Neutralisationslösung geschwenkt. Nach der Denaturierung der DNA wurde diese vom Agarosegel auf eine Nylonmembran (Nytran[®] SuperCharge) übertragen. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Kapillarblots.

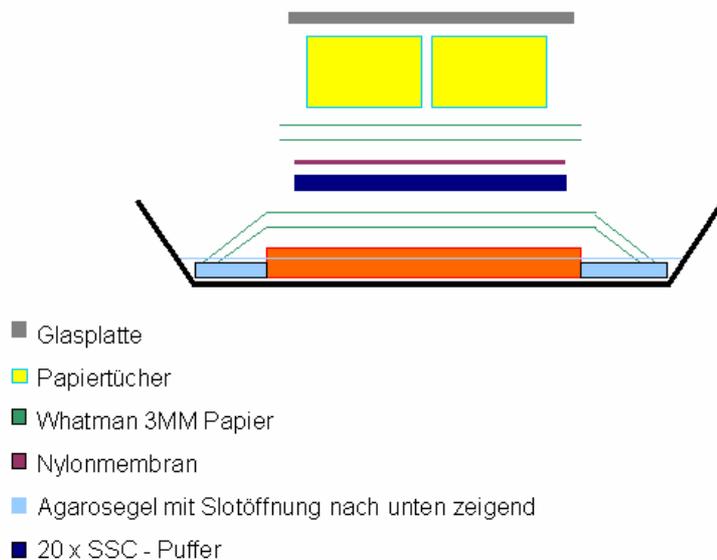


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Kapillarblots

Auf einer Glasplatte wurden übereinander zwei mit 20 x SSC getränkte Whatmanpapiere, das Gel, die Nylonmembran, vier in 2 x SSC getränkte Whatmanpapiere und ein etwa 10 cm hoher Stapel Papierhandtücher gelegt. Die unteren Whatmanpapiere wurden dabei so zugeschnitten, dass sie über die Glasplatte hinausragten und in eine mit 20 x SSC gefüllte Wanne hineinragten. Alle weiteren Papiere sowie die Membran wurden genau der Größe des Gels angepasst. Beim Aufbau musste darauf geachtet werden, dass jedes Papier, das Gel und die Membran luftblasenfrei auflagen, um eine größtmögliche Kapillarkraft zu gewährleisten. Diese wurde zusätzlich durch das Auflegen eines Gewichts auf den Papierstapel erhöht. Durch die Kapillarkraft wurde nun über Nacht der größte Teil der sich im Gel befindlichen DNA auf die Membran übertragen.

Am nächsten Tag wurde der Aufbau vorsichtig umgedreht und abgebaut. Die Membran wurde in 6 x SSC Puffer gewaschen und anschließend getrocknet. Als Positivkontrolle dienten 0,5 µl der entsprechenden Sonde, die im unteren Bereich der Membran nachträglich aufgebracht wurden. Um die DNA zu fixieren, wurde die Membran zweimal für eine Minute bei 150 mJ in der UV-Kammer mit UV-Licht behandelt. UV-Strahlung bewirkte die kovalente Bindung von Pyrimidinen der DNA an die Membran. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran zunächst für eine

Stunde bei 42 °C im Hybridisierungssofen mit 25 ml ECL-Hybridisierungslösung (ECL™ Detection Kit, Amersham/GE Healthcare) vorhybridisiert.

Zur Sondenherstellung wurden etwa 300 ng DNA benötigt. Die entsprechende Menge an Sonden-DNA wurde bei 100 °C für zehn Minuten denaturiert und anschließend zehn Minuten auf Eis gestellt, um die Religation der beiden DNA-Einzelstränge zu verhindern. Nacheinander wurden dann 10 µl „labeling reagent“ und 10 µl Glutaraldehyd (Enhanced Chemiluminescent Labeling (ECL)-System, Amersham/GE Healthcare) zugegeben und gemischt. Anschließend wurde die Mischung zehn Minuten bei 37 °C inkubiert, was zu einer kovalenten Bindung der Markierung an die DNA führte. Nachfolgend wurde die entsprechende Sonde direkt in die Hybridisierungslösung zur Membran zugegeben und ebenfalls bei 42 °C über Nacht im Hybridisierungssofen inkubiert.

Um nicht gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Morgen zweimal für 20 Minuten bei 42 °C mit Waschlösung und zweimal für fünf Minuten bei RT mit 2 x SSC gewaschen. Die ECL™-Entwicklerlösungen wurden nach dem Hersteller-Protokoll frisch angesetzt und direkt auf die Membran gegeben und eine Minute unter Schwenken inkubiert. Vor dem Auflegen des Films (Hyperfilm™ ECL) in der Dunkelkammer, wurde die Membran luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschlagen. Anschließend wurde die Membran in eine Filmkassette zuerst für zwei Minuten und danach nochmals 20 Minuten lang auf einen Röntgenfilm (X-OMAT, Fa. Kodak) gelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Phänotypische Tests

Die Abbildung zeigt beispielhaft das Hämolyseverhalten der *E. coli* Mastitis-Isolate 1759, 1762, 1771, 1775, 1779, 1780, und 1781.

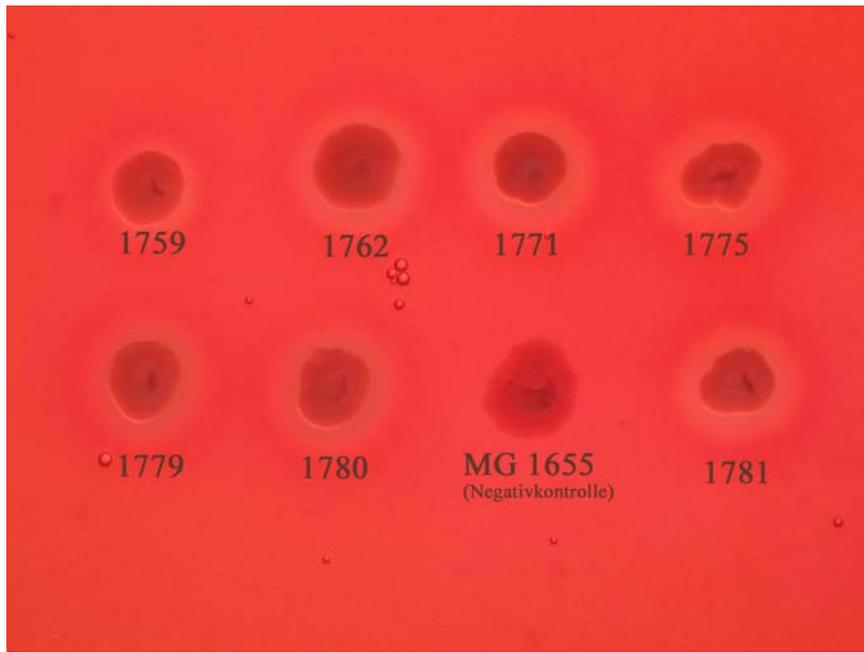


Abb. 2: Phänotypischer Test *hlyA*

3.2. Nachweis der spezifischen Virulenzfaktoren (Beschreibung der Einzelgen-Analyse)

Mit Hilfe der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion wurden die genomische DNA von *E. coli*-Isolaten boviner Mastitiden auf die Anwesenheit der in der Einleitung charakterisierten Gene, die für Virulenzfaktoren in extraintestinal-pathogenen *E. coli*-Stämmen kodieren, untersucht. Die spezifischen Bandenmuster, die mit den jeweiligen Primerpools 1, 2, 3 und 4 nach Agarose-Gelelektrophorese erhalten wurden, erlaubten eine eindeutige Zuordnung zur genetischen Ausstattung der *E. coli*-Isolate, die von Fällen mit eindeutiger boviner Mastitis isoliert wurden. Diese Zuordnung betraf sowohl

den positiven Nachweis, d. h. das Vorhandensein der Virulenzfaktorgene (VF) als auch deren Abwesenheit.

Insgesamt wurde das Vorkommen 42 Virulenz-assoziiierter Gene von *E. coli* in 222 *E. coli*-Isolate boviner Mastitiden in dieser Untersuchung verifiziert. In einem ersten Analyseansatz wurden 198 Isolate in die Untersuchung einbezogen. Die vier Primerpools repräsentierten zunächst 30 spezifische VF-Gene. Die stammspezifischen Ergebnisse pro Stamm sind im Anhang aufgeführt.

Bei der PCR-Analyse von insgesamt 222 pathogenen *E. coli* Isolaten ergab sich eine sehr große Spannbreite im Vorkommen innerhalb der untersuchten 30 VF Gene. Sie reichte von 0% bei den Adhäsinen tierpathogener *E.coli* (K88, K99, F41, 987P und F18) sowie *nfaE* und *afa/draBC* bis zu dem deutlich dominanten 88,7% (vgl. Tab. 7) bei dem Mannose-spezifischen Adhäsिन der TypI-Fimbrien (*fimH*). Einen weiteren häufigen Virulenzfaktor stellte das Gen für das an der Serumresistenz-beteiligte Protein TraT mit 43,7% dar. Bei der Analyse der Siderophor-kodierenden Gene war das Yersiniabactin-Rezeptorgen *fyuA* mit 12,2% häufiger detektierbar als das Aerobactin-Rezeptorgen *iutA* (6,3%). Der Vergleich zwischen den Sialosyl-spezifischen Adhäsinen ergab ein gleich häufiges Auftreten von *focG* (0,4%) und *sfaS* (0,9%). Die Analyse der Toxingene zeigte eine höhere Prävalenz für Hämolysin *hlyA* (10,8%) gegenüber dem Toxin CDT 1 *cdtB* (2,7%) und dem Gen für den cytotoxisch nekrotisierenden Faktor CNF-1, *cnf1* (2,3%) (vgl. Tab. 7).

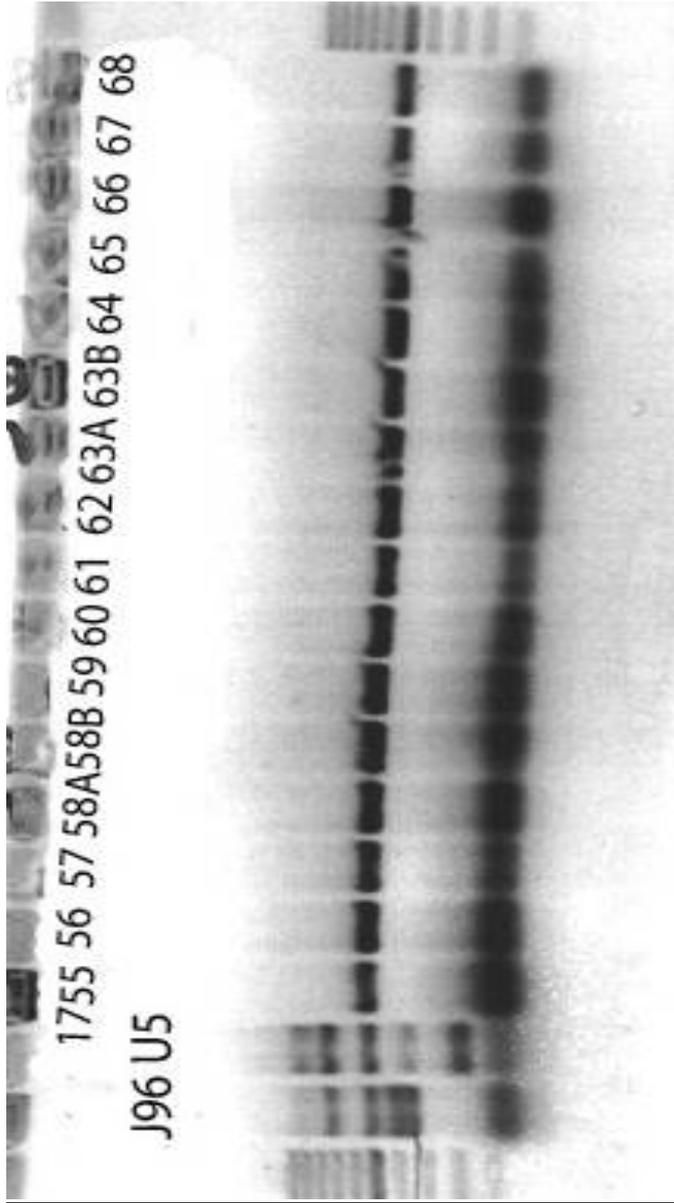
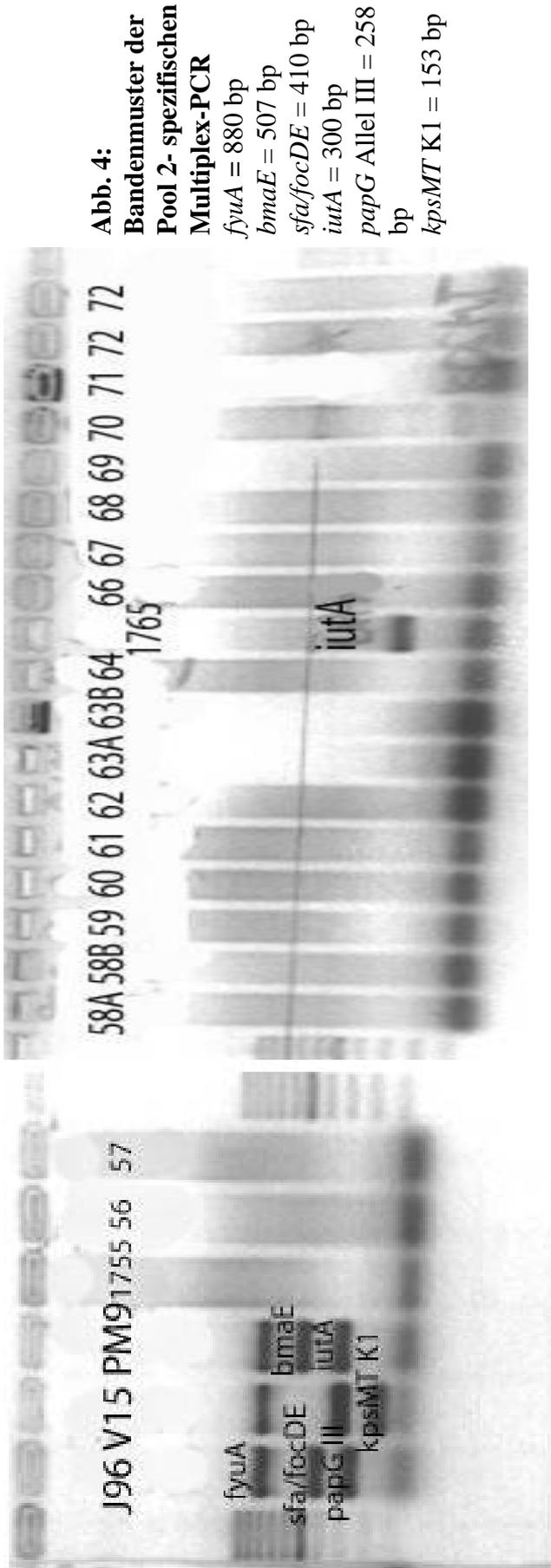


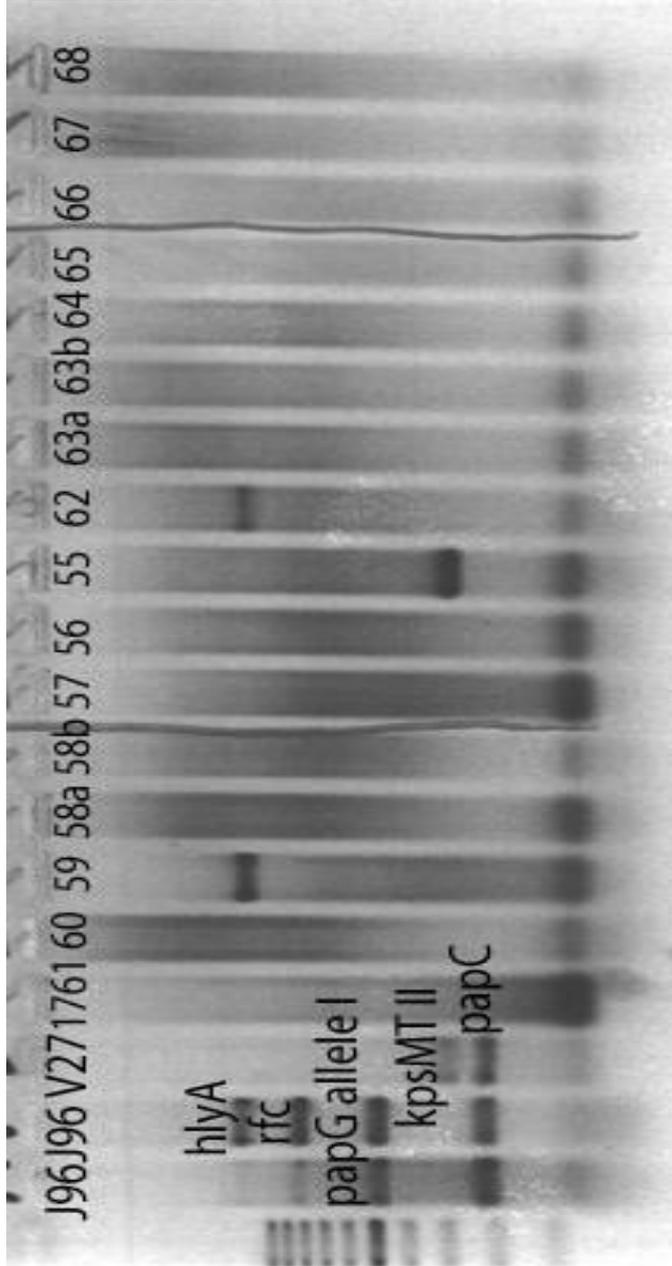
Abb. 3:
Bandenmuster der
Pool 1-spezifischen
Multiplex-PCR
 PAI = 930 bp
papAH = 720 bp
fimH = 508 bp
kpsMT III = 392 bp
papEF = 336 bp
ibeA = 170 bp

PAI
papAH
fimH
kpsMT III + *papEF*
ibeA

Die Stämmnummern der jeweiligen *E. coli*-Isolate sind in der Abbildung vermerkt.
 Die Identität der verschiedenen Positivkontrollen ist am linken Bildrand vermerkt.



Die Stammmummern der jeweiligen *E. coli*-Isolate sind in der Abbildung vermerkt.
 Die Identität der verschiedenen Positivkontrollen ist am linken Bildrand vermerkt



**Abb. 5: Bandenmuster
der Pool 3-spezifischen
Multiplex-PCR**

hlyA = 1.177 bp
rfc = 788 bp
rfc = 559 bp
papG Allel I = 461bp
kpsMT II = 272 bp
papC = 200 bp

Die Stämmnummern der jeweiligen *E. coli*-Isolate sind in der Abbildung vermerkt.
 Die Identität der verschiedenen Positivkontrollen ist am linken Bildrand vermerkt.

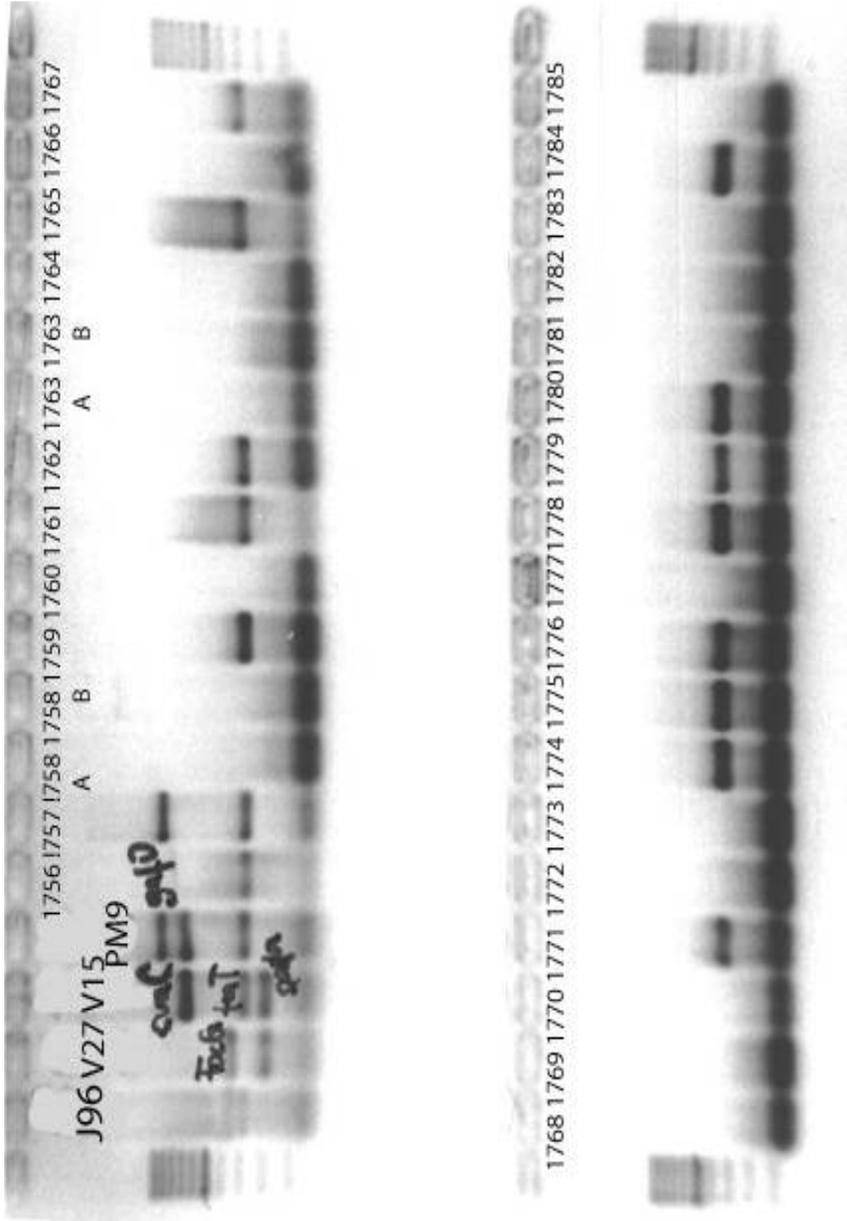


Abb. 6: Bandenmuster der Pool 4-spezifischen Multiplex-PCR
gafD = 952 bp
cvaC = 680 bp
focG = 360 bp
traT = 290 bp
papG Allel II = 190 bp

Die Stämmnummern der jeweiligen *E. coli*-Isolate sind in der Abbildung vermerkt.
 Die Identität der verschiedenen Positivkontrollen ist am linken Bildrand vermerkt.

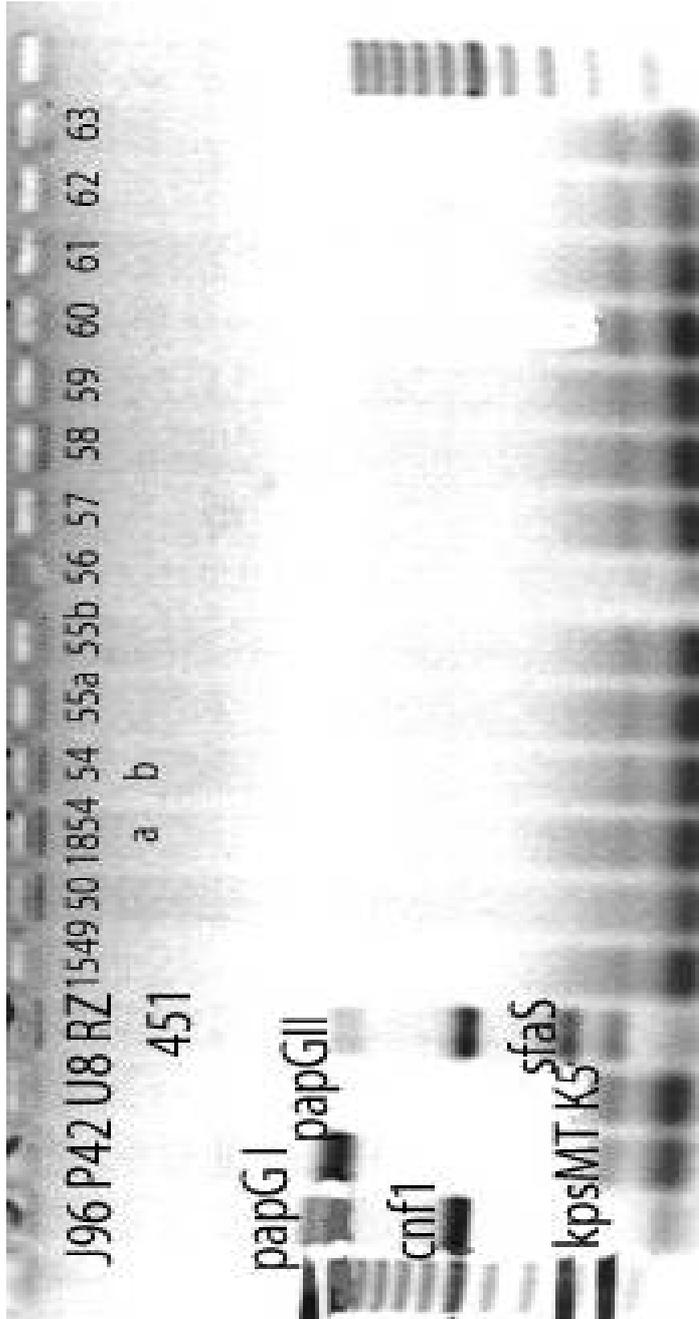


Abb. 7:
Bandenmuster der
Pool 5-spezifischen
Multiplex-PCR
papGI = 1.190 bp
papGII = 1.070 bp
cnf1 = 498 bp
sfaS = 240 bp
kpsMT K5 = 156 bp

Die Stämmnummern der jeweiligen *E. coli*-Isolate sind in der Abbildung vermerkt.
 Die Identität der verschiedenen Positivkontrollen ist am linken Bildrand vermerkt.

3.3. Quantitative Bestimmung von genetischen Virulenzfaktor-Mustern in den Mastitis-assoziierten ExPEC

Neben der oben beschriebenen quantitativen Bestimmung des Vorkommens jedes Einzelgens wurde in dieser Arbeit eine weitergehende differenzierte Auswertung von Genkombinationen vorgenommen. Ziel war es, das Auftreten von Kombinationen der 42 untersuchten Virulenzfaktoren ebenfalls quantitativ zu erfassen. Im Ergebnis sollten die Stämme bestimmten genetischen Virulenzfaktor-Mustern zugeordnet werden. Die Einteilung erfolgte nach der Zahl der miteinander auftretenden Virulenzfaktor-Gene:

a) kein Virulenzgen nachweisbar, b) ein singuläres Virulenzgen nachweisbar, c) zwei Virulenzgene nachweisbar, gegliedert nach der spezifischen Zweierkombination (= Zahl der Muster), d) drei Virulenzgene nachweisbar, gegliedert nach Art und Zahl der Dreierkombinationen, e) vier Virulenzgene nachweisbar, gegliedert nach Art und Zahl der Viererkombinationen und schließlich f) 5 und mehr (bis zu 18) Virulenzgene nachweisbar pro Genom. Auch hier wurde nach Art und quantitativen Anteil der Kombination, d. h. des Genmusters differenziert. Diese Bestimmung der Prävalenz des Auftretens von Mastitis-assoziierten Virulenzgenmustern bei den *E. coli*-Erregern sollte erlauben, die Faktoren mit der wahrscheinlich höchsten Relevanz in der Pathogenese zu identifizieren. Es wurde davon ausgegangen, dass die Analyse der Genmuster die Sicherheit bei der Wichtung des Beitrags der einzelnen Faktoren deutlich erhöht und die bereits vorgestellte Erfassung der Einzelgene verbessert. Die Bewertung dieses Ansatzes erfolgt ausführlich in der Diskussion.

Die genetischen Muster werden zur:

1. Prävalenz der in der Gesamtheit der Isolate,
2. Prävalenz in den phylogenetischen ECOR-Gruppen,
3. akut klinischen und chronischen Mastitis-Episoden,
4. dem Vorkommen spezifisch tierpathogener Adhäsine korreliert.

In den folgenden Tabellen ist die Analyse der Genmuster entsprechend diesen Korrelationen aufgelistet.

3.4. Häufigkeitsverteilung der Gene (Gesamtanalyse)

Das Gen *fimH*, welches für die mannosespezifische Adhäsionseinheit der Typ 1-Fimbrien kodiert, konnte in 197 der insgesamt 222 *E. coli* Isolaten detektiert werden, was einem Gesamtanteil von 88,7% entspricht. 24 Stämme waren laut PCR *fimH*-negativ. In der Mehrzahl dieser Fälle (14) konnten in den *E. coli*-Isolaten keine weiteren Virulenzdeterminanten festgestellt werden. Als Ausnahmen erwiesen sich 12 *fimH*-negative Stämme: 933, 1798, 1807, 1815, 1816, 1819, 1835 und 1850, in denen das für einen Serumresistenz-Faktor kodierende Gen *traT* auftrat oder im Fall des *fimH*-negativen *E. coli*-Stammes 1265, der sich positiv für *kpsMTII* und *kpsMT K5* zeigte. Außerdem der Stamm 2124A, der Virulenzfaktorgene *iroN*, *iss* und *F17* enthielt. Auch die *fimH*-negativen Stämme 1556 und 1859 wurden für *iss* und *F17* positiv getestet.

Die weiteren Adhäsingene wiesen insgesamt eine geringe Anzahl positiver PCR-Ergebnisse auf. *sfaS*, das für ein Adhäsion der S-Fimbrien kodiert, zeigte nur in drei Fällen (1,4%) positive Bandenmuster. Ebenfalls war *sfa/focDE* nur in zwei (0,9%) klinischen Mastitis-Isolaten nachzuweisen.

FocG, ein Adhäsion der F1C-Fimbrien, stellte sich in nur einem klinischen Mastitis Isolat dar (0,4%). Das Mannose-resistente Adhäsion-kodierende Gen *gafD*, das für Glukosaminyl-spezifische G-Fimbrien kodiert, wurde mit 1,3% nachgewiesen. Ebenso das Gen für M-Blutgruppen-Antigen spezifische M-Fimbrien *bmaE* (1,3%).

F17-Fimbrien, ein Adhäsion der F17-Fimbrienfamilie konnte 14-mal (6,3%) detektiert werden.

Die nichtfimbrien Adhäsion 1-Determinante *nfaE* stellte sich in den Multiplex-PCRs nicht dar.

Das zweithäufigste Vorkommen in der Gesamtzahl der klinischen Mastitisisolate zeigte das Serum-Resistenzgen *traT*, welches sich in 97 Stämmen (43,7%) als PCR-Signal nachweisen ließ, davon mit 19,3% (vgl. Tab.8) in Kombination mit *fimH* zu finden war. Das ebenfalls für Serumresistenzen verantwortliche Gen *iss* ergab 19 (8,5%) positive Ergebnisse im Gesamtbild. Das für den Siderophorrezeptor Yersiniabactin kodierende Gen *fyuA* ließ sich in 27 (12,2%) der 222 *E.coli*-Isolate nachweisen sowie in 14 Fällen (6,3%) das Aerobaktinrezeptorgen *iutA*. Ein weiteres von *E. coli* genutztes

Eisenaufnahmesystem, Salmochelin, was von den *iroN-B* Genen kodiert wird, zeigte im Fall des Gens *iroN* insgesamt 12 (5,4%) positive Bandenmuster.

Das für das Toxin α -Hämolyysin kodierende Gen *hlyA* wurde mit einer Prozentzahl von insgesamt 10,8% (24) ermittelt.

Der zytotoxisch nekrotisierende Faktor 1, kodiert von *cnf 1*, als weiterer Vertreter der Toxine, ergab fünf (2,3%) positive Ergebnisse, die ausschließlich aus den akuten Mastitis-Stämmen hervorgingen.

Das zytolethal-distendierende Toxin *cdtB*, das für das Toxin CDT 1 kodiert, war in sechs Isolaten (2,7%) vertreten. Vier (2,3%) positive PCR-Ergebnisse zeigten das für die Serogruppe O4-LPS-Synthese kodierende *rfc*-Gen.

Das für die Invasion ins Hirnendothel verantwortliche Gen *ibeA* zeigte nur in sechs Fällen (2,7%) eine positive Signal-Bande. Ein weiteres für Invasion verantwortliches Gen, *gimB*, wurde in nur zwei Isolaten (0,9%) nachgewiesen.

Im Falle der verschiedenen *pap*-Pathogenitätsfaktoren konnte *papAH* mit acht (3,6%) positiven *E.coli*-Isolaten am häufigsten nachgewiesen werden.

Die Gene *papEF* und *papC* ergaben sieben (3,1%) positive PCR-Ergebnisse.

Die für P-Fimbrien kodierende *papG* Allele waren in ihrer Häufigkeit unterschiedlich verteilt. Das *papG* Allel III konnte 6-mal (2,7%) nachgewiesen werden, dagegen wurden *papG* Allel I und II nur einmal (0,4%) positiv getestet.

Die *pap* GII/III-spezifische PCR ergab 3-mal (1,4%) einen positiven Nachweis, die für *papG* I einmal (0,4%). Alle genannten Gene der verschiedenen P-Fimbriendeterminanten konnten nur in akuten Mastitis-Isolaten nachgewiesen werden.

Das für die Kapselsynthese wichtige Gen *kpsMT* II erwies sich in 11 Fällen (4,9%) als positives Ergebnis, dagegen konnten die Kapselgene *kpsMT* K5 nur 6-mal (2,7%), *kpsMT* K1 und *kpsMT* III nur 2-mal (0,9%) positiv ermittelt werden. PAI, das für eine Pathogenitätsinsel des uropathogenen *E. coli* Stammes CFT073 spezifische Gen steht, wurde mit neun positiven Isolaten mit insgesamt 4,1% nachgewiesen.

Die für weitere Adäsine kodierenden Gene *afa7* und *afa 8* wurden in jeweils vier (1,8%) und 5 (2,3%) Isolaten positiv ermittelt.

Das Gen *pks* steht für die genomische *pks*-Insel der *E. coli* Bakterien und konnte als Pathogenitätsfaktor 6-mal (2,7%) nachgewiesen werden.

In der Multiplex-PCR konnten folgende Pathogenitätsfaktoren nicht nachgewiesen werden: *nfaE*, *afa/draBC*. Außerdem negativ waren die Gene für K88, K99, F41, 987P und F18-Fimbrien der insgesamt acht untersuchten Virulenzfaktoren spezifisch für tierpathogene, insbesondere Kuh- und Schweine-pathogener *E. coli*.

Tab.7: Häufigkeitsverteilung der Gene (Gesamtanalyse)

	<i>rfc</i>	<i>gafD</i>	<i>afa/dra BC</i>	<i>traT</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>cdtB</i>	<i>fyuA</i>	<i>iutA</i>	<i>iroN</i>	<i>pks</i>
Chronisch n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (57,1)	5 (23,8)	0	1 (4,7)	3 (14,2)	2 (9,5)	1 (4,7)	1 (4,7)
n (%)	4 (2,0)	3 (1,5)	0 (0)	85 (42,7)	19 (9,5)	5 (2,5)	5 (2,5)	24 (12,0)	12 (6,0)	11 (5,5)	5 (2,5)
Subklin. No.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt n (%)	4 (2,3)	3 (1,3)	0 (0)	97 (43,7)	24 (10,8)	5 (2,3)	6 (2,7)	27 (12,2)	14 (6,3)	12 (5,4)	6 (2,7)

	<i>iss</i>	<i>gim B</i>	F17	K88	K99	F41	987 P	F18	<i>afa8</i>	<i>afa7</i>	<i>fim H</i>
Chronisch n (%)	2 (9,5)	1 (4,7)	1 (4,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4,7)	1 (4,7)	18 (85,7)
n (%)	17 (8,5)	1 (0,5)	12 (6,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2,0)	3 (1,5)	176 (88,5)
Subklin. No.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Gesamt n (%)	19 (8,5)	2 (0,9)	14 (6,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (2,3)	4 (1,8)	197 (88,7)

	<i>pap</i> <i>AH</i>	<i>pap</i> <i>EF</i>	<i>pap</i> <i>C</i>	<i>papG</i> Allel I	<i>papG</i> Allel II	<i>papG</i> Allel III	<i>pap</i> <i>GI</i>	<i>pap</i> GII. III	<i>sfa/foc</i> <i>DE</i>	<i>foc</i> <i>G</i>
Chronisch n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
n (%)	8 (4,0)	7 (3,5)	7 (4,0)	1 (0,5)	1 (0)	6 (3,0)	1 (0,5)	3 (1,5)	2 (1,0)	1 (0,5)
Subklin. No.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt n (%)	8 (3,6)	7 (3,1)	7 (3,1)	1 (0,4)	1 (0,4)	6 (2,7)	1 (0,4)	3 (1,4)	2 (0,9)	1 (0,4)

	<i>sfa</i> <i>S</i>	<i>cva</i> <i>C</i>	<i>kpsMT</i> III	<i>kpsMT</i> II	<i>kpsMT</i> K5	<i>kpsMT</i> K1	<i>ibe</i> <i>A</i>	PAI	<i>bma</i> <i>E</i>	<i>nfa</i> <i>E</i>
Chronisch n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4,7)	0 (0)	1 (4,7)	1 (4,7)	1 (4,7)	0 (0)	0 (0)
n (%)	3 (1,5)	1 (0,5)	2 (1,0)	10 (5,0)	6 (3,0)	1 (0,5)	5 (2,5)	8 (4,0)	3 (1,5)	0 (0)
Subklin. No.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt n (%)	3 (1,4)	1 (0,4)	2 (0,9)	11 (4,9)	6 (2,7)	2 (0,9)	6 (2,7)	9 (4,1)	3 (1,3)	0 (0)

Tab. 8: Virulenzfaktorverteilung der 222 *E. coli* Stämme

VF-Gene pro St.	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%](n=222)
Keine VF-Gene		13	(5,8)
1 singuläres VF-Gen pro Stamm (83 Isolate)	<i>fimH</i> <i>traT</i> <i>iss</i> F17	74 7 1 1	(33,3) (19,3) (0,4) (0,4)

2 VF-Gene pro Stamm (69 Isolate, 63 <i>fimH</i> ⁺)	<i>fimH, traT</i>	43	(19,3)
	<i>fimH, fyuA</i>	5	(2,2)
	<i>fimH, afa7</i>	4	(1,8)
	<i>fimH, iss</i>	3	(1,3)
	<i>fimH, hlyA</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, F17</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, afa8</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, kpsMT II</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, kpsMT III</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, kpsMT K5</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, cdtB</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, iutA</i>	1	(0,4)
	<i>traT, fynA</i>	2	(0,9)
	<i>fyuA, afa8</i>	1	(0,4)
3 VF-Gene pro Stamm (34 Isolate, 34 <i>fimH</i> ⁺)	<i>fimH, traT, hlyA</i>	9	(4,0)
	<i>fimH, traT, intA</i>	4	(1,8)
	<i>fimH, traT, F17</i>	3	(1,3)
	<i>fimH, traT, fyuA</i>	3	(1,3)
	<i>fimH, hlyA, F17</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, traT, rfc</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, iron, iss</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, traT, iss</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, sfaS, fyuA</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, traT, iron</i>	1	(0,4)
	<i>fim, traT, cdtB</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, traT, gafD</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, fyuA, afa8</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, int, iss</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, fyuA, hlyA</i>	1	(0,4)
4 VF-Gene pro Stamm (7 Isolate, 7 <i>fimH</i> ⁺)	<i>fimH, fyuA, intA, traT</i>	2	(0,4)
	<i>fimH, rfc, traT, hlyA</i>	2	(0,9)
	<i>fimH, traT, iss, F17</i>	1	(0,9)
	<i>fimH, traT, fyuA, iss</i>	1	(0,4)
	<i>fimH, kpsMT K1, ibeA, traT</i>	1	(0,4)
5-18 VF-Gene pro Stamm (16 Isolate, 16 <i>fimH</i> ⁺)	5 VF-Gene	3 verschiedene	je (0,4)
	6 VF-Gene	3 verschiedene	je (0,4)
	7 VF-Gene	2 verschiedene	je (0,4)
	9 VF-Gene	1	(0,4)
	10 VF-Gene	1	(0,4)
	11 VF-Gene	1	(0,4)
	12 VF-Gene	1	(0,4)
	13 VF-Gene	1	(0,4)
	14 VF-Gene	2 verschiedene	je (0,4)
	18 VF-Gene	1	(0,4)
	(zus. 16 Isolate)	(zus. 7,2)	

Tab. 9: Virulenzfaktorverteilung der mit chronischer Mastitis assoziierter *E. coli*-Isolate

VF-Gene pro chron. Mastitis-Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%](n=21)
Keine VF-Gene		2	(9,5)
1 singuläres VF- Gen	<i>fimH</i>	5	(23,8)
2 VF-Gene	<i>fimH, traT</i>	6	(28,6)
	<i>fimH, hlyA</i>	1	(4,7)
3 VF-Gene	<i>fimH, traT, hlyA</i>	1	(4,7)
	<i>fimH, traT, intA</i>	1	(4,7)
	<i>fimH, fyuA, hlyA</i>	1	(4,7)
4 VF-Gene	<i>fimH, rfc, traT, hlyA</i>	1	(4,7)
	<i>fimH, traT, fyuA, iss</i>	1	(4,7)
6 VF-Gene	<i>fimH, traT, iron, iss, F17, afa8</i>	1	(4,7)
12 VF-Gene	<i>fimH, kpsMT II, kpsMT K1, ibeA, PAI, traT, hlyA, cdtB, fyuA, iutA, pks, gimB</i>	1	(4,7)

3.5. Phylogenetische Einteilung der ECOR-Gruppen

Phylogenetische Verteilung von VF

Die verschiedenen Virulenzfaktoren sind assoziiert mit den phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D. Außerdem gibt es eine mögliche Beziehung zu den O:K:H Serotypen. Dies könnte eine Kategorisierung ergeben, wonach man:

1. Anzahl an Virulenzgenen assoziiert mit ECOR-Gruppe B2,
2. Assoziation von Virulenzgenen mit ECOR-Gruppe B1 und
3. keine Beziehungen zwischen dem Auftreten von Virulenzgenen und den ECOR-Gruppen B1 und B2 unterscheiden kann.

Bei der ECOR-Gruppe B2-assoziierten VF, unterscheidet man zusätzlich drei Subgruppen. Die erste beinhaltet *sfa/foc, sfaS, focG, cnf1, cdtB, rfc* und *ibeA*.

Tab. 10: ECOR A-Gruppe (klinisch): 122 Stämme

VF-Gene assoziiert mit ECOR-Gruppe A Stämme (chronisch)	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%] (n=122)
Keine VF-Gene		9	(7)
1 singuläres VF-Gen	<i>fimH</i> <i>traT</i> <i>iss</i>	47 3 1	(38,8) (2,5) (0,8)
2 VF-Gene	<i>fimH, traT</i> <i>fimH, fyuA</i> <i>fimH, iss</i> <i>fimH, afa7</i> <i>fimH, gimB</i> <i>fimH, F17</i> <i>fimH, hlyA</i> <i>traT, hlyA</i> <i>traT, fyuA</i>	17 3 2 2 1 1 1 1 1 1	(14,0) (2,4) (1,6) (1,6) (0,8) (0,8) (0,8) (0,8) (0,8) (0,8)
3 VF-Gene	<i>fimH, traT, hlyA</i> <i>fimH, traT, fyuA</i> <i>fimH, traT, F17</i> <i>fimH, traT, iss</i> <i>fimH, iroN, iss</i> <i>fimH, rfc, traT</i> <i>fimH, hlyA, F17</i> <i>fimH, iroN, iss</i> <i>fimH, fyuA, iss</i> <i>fimH, fyuA, afa8</i> <i>fimH, traT, iutA</i> <i>traT; fyuA, afa8</i>	4 3 3 2 2 2 2 2 2 1 1 1 1	(3,3) (2,5) (2,5) (1,6) (1,6) (1,6) (1,6) (1,6) (1,6) (0,8) (0,8) (0,8) (0,8)
4 VF-Gene	<i>fimH, fyuA, iutA, traT</i> <i>fimH, rfc, traT, hlyA</i> <i>fimH, traT, iss, gimB</i>	2 1 1	(1,6) (0,8) (0,8)
5-18 VF-Gene (Details siehe Tab. 20)	5 VF-Gene 6 VF-Gene 7 VF-Gene 11 VF-Gene	je 2 verschiedene 1 verschiedene 1 verschiedene 1 verschiedene zus. 5	je (0,8) (0,8) (0,8) (0,8) (0,8) (4,1)

Tab. 11: ECOR A-Gruppe (chronisch): 12 Stämme

VF-Gene pro ges. Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%] (n=12)
Keine VF-Gene		1	(8,3)
1 singuläres VF-Gen	<i>fimH</i>	1	(8,3)
2 VF-Gene	<i>fimH, traT</i> <i>fimH, hlyA</i>	3 1	(25) (8,3)
3 VF-Gene	<i>fimH, traT, iutA</i> <i>fimH, traT, hlyA</i> <i>fimH, hlyA, fyuA</i> <i>iroN, iss, F17</i>	1 1 1 1	(8,3) (8,3) (8,3) (8,3)
4 VF-Gene	<i>fimH, rfc, traT, hlyA</i> <i>fimH, traT, fyuA, iss</i>	1 1	(8,3) (8,3)

Tab. 12: ECOR A-Gruppe (subklinisch): 2 Stämme:

VF-Gene pro ges. Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%](n=2)
Keine VF-Gene			
1 singuläres VF-Gen	<i>fimH</i> F17	1 1	

Tab. 13: ECOR B1-Gruppe (klinisch): 54 Stämme

VF-Gene pro ges. Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%] (n=54)
Keine VF-Gene		2	(3,7)
1 singuläres VF-Gen	<i>fimH</i> <i>traT</i>	24 1	(44,4) (1,8)
2 VF-Gene	<i>fimH, traT</i> <i>fimH, afa8</i> <i>fimH, cdtB</i> <i>fimH, iss</i>	14 1 1 1	(25,9) (1,8) (1,8) (1,8)
3 VF-Gene	<i>fimH, traT, hlyA</i> <i>fimH, traT, fyuA</i> <i>fimH, traT, iroN</i> <i>fimH, traT, gafD</i>	4 1 1 1	(5,5) (1,8) (1,8) (1,8)
4 VF-Gene	<i>traT, fyuA, iron, iss</i>	1	(1,8)
5-18 VF-Gene (Details siehe Tab. 20)	6 VF-Gene 11 VF-Gene	1 verschiedene 1 zus. 2	je (1,8) je (1,8) (3,7)

Tab. 14: ECOR B1-Gruppe (chronisch): 8 Stämme

VF-Gene pro ges. Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%] (n=8)
Keine VF-Gene		1	(12,5)
1 singuläres VF-Gen	<i>fimH</i>	3	(25,0)
2 VF-Gene	<i>fimH, traT</i>	4	(33,3)

Tab. 15: ECOR B2-Gruppe (klinisch): 9 Stämme

VF-Gene pro ges. Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%] (n=9)
2 VF-Gene	<i>fimH, traT</i>	1	
4 VF-Gene	<i>fimH, ibeA, PAI, traT</i>	1	
5-18 VF-Gene (Details siehe Tab. 20)	6 VF-Gene	2 verschiedene	(22,2)
	7 VF-Gene	1 verschiedene	(11,1)
	9 VF-Gene	1 verschiedene	(11,1)
	14 VF-Gene	1 verschiedene	(11,1)
	15 VF-Gene	1 verschiedene	(11,1)
	18 VF-Gene	1 verschiedene zus. 7	(77,8)

Tab. 16: ECOR B2-Gruppe (chronisch): 1 Stamm

VF-Gene pro ges. Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%] (n=1)
5-18 VF-Gene (Details siehe Tab. 20)	12VF-Gene	1	(100)

Tab. 17: ECOR D-Gruppe (klinisch): 13 Stämme

VF-Gene pro ges. Stämme	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme	Prävalenz [%]
1 singuläres VF-Gen	<i>traT</i>	2	(7,6)
	<i>fimH</i>	1	(15,4)
2 VF-Gene	<i>fimH, traT</i>	3	(23,1)
	<i>fimH, kpsMT II</i>	1	(7,6)
	<i>fimH, kpsMT III</i>	1	(7,6)
3 VF-Gene	<i>fimH, traT, iutA</i>	2	(15,4)
5-18 VF-Gene (Details siehe Tab. 20)	5VF-Gene	2 verschiedene	(15,4)
	9VF-Gene	1 verschiedene	

Tab. 18: Genkombinationen der ECOR-Gruppen > 5VF

VF-Gene pro Stamm	Vorhandene Virulenzgene	Anzahl positiver Stämme
5 VF-Gene	<i>fimH, kpsMTIII, kpsMTII, iss, F17</i>	1
	<i>fimH, bmaE, traT, iutA, afa7</i>	1
	<i>fimH, gafD, cdtB, fyuA, F17</i>	1
	<i>fimH, traT, fyuA, ironN, iss</i>	1
6 VF-Gene	<i>fimH, traT, ironN, iss, F17, afa8</i>	1
	<i>fimH, traT, hlyA, cdtB, pks, ibeA</i>	1
	<i>fimH, papAH, kpsMTII, traT, fyuA, iutA</i>	1
7 VF-Gene	<i>fimH, sfa/focDE, focG, PAI, hlyA, fyuA, iutA</i>	1
9 VF-Gene	<i>fimH, kpsMTII, ibeA, PAI, traT, hlyA, iutA, fyuA, pks</i>	1
	<i>fimH, cvaC, kpsMTII, kpsMT K5, PAI, traT, iutA, ironN, iss</i>	1
10 VF-Gene	<i>fimH, papAH, papEF, papC, papG Allel III, bmaE, traT, hlyA, cnf1, fyuA</i>	1
11 VF-Gene	<i>fimH, papAH, papEF, papC, papG Allel III, sfa/focDE, traT, hlyA, cnf1, iutA, ironN</i>	2
12 VF-Gene	<i>fimH, kpsMTII, kpsMT K1, ibeA, PAI, traT, hlyA, cdtB, fyuA, iutA, pks, gimB</i>	1
14 VF-Gene	<i>fimH, papAH, papEF, papC, papG Allel II/III, papG Allel II, sfaS, kpsMT II, kpsMT K5, PAI, cnf1, fyuA, ironN, pks, iss</i>	1
	<i>fimH, papAH, papEF, papC, papG Allel II, sfaS, kpsMT II, kpsMT K1, PAI, hlyA, cnf1, fyuA, ironN, pks</i>	1
18 VF-Gene	<i>fimH, papAH, papEF, papC, papG Allel II/III, papGII, kpsMT II, kpsMT K5, PAI, rfc, hlyA, cnf1, fyuA, ironN, pks, iss, gimB</i>	1

3.6. Vergleich der ECOR-Gruppen

Die Einteilung der untersuchten extraintestinal pathogenen *E. coli*-Isolate erfolgt in die sogenannten ECOR (*E. coli* collection of reference strains)-Gruppen, gemäß ihrer phylogenetischen Herkunft. Repräsentativ für die ECOR-Gruppe A waren 122 *E. coli*-Stämme, von denen neun Isolate keine Gene für VFs zeigten. Mit 38% war *fimH* als singulärer VF am häufigsten vertreten, gefolgt von 14% positiven Stämmen mit der *fimH-traT*-Kombination. Die chronischen und subklinischen Gruppe-A Isolate können aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht für ein statistisches Ergebnis herangezogen werden.

Der ECOR-Gruppe B1 wurden 54 Stämme zugeordnet, die vergleichbar mit den Isolaten der ECOR-Gruppe A sind. Auch hier war der singuläre VF *fimH* mit 44% das häufigste Ergebnis. Außerdem waren *fimH* und *traT* als gleichzeitig nachgewiesene Virulenzgene mit 14% das zweithäufigste Ergebnis. Zwei der *E. coli*-Isolate dieser Gruppe zeigten keine der hier untersuchten Virulenzgene.

Die Untersuchung der neun ECOR Gruppe B2-Stämme zeigte, daß in sieben dieser Isolate viele der untersuchten Virulenzgene gleichzeitig vorliegen. Zwischen 6 und 18 Virulenzgene konnten dabei in einem Stamm nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Stämme der ECOR B2-Gruppe lässt Rückschlüsse auf eine generelle VF-Ansammlung innerhalb dieser ECOR-Gruppe B2 schließen, da auch bei wenig untersuchten Stämmen etwa 80% diese hohe Anzahl der Virulenzfaktoren zeigten.

3.7. Vergleich der Verbreitung tierspezifischer Virulenzgene innerhalb der ECOR-Gruppen

Insgesamt wurden 222 Mastitis *E. coli*-Stämme untersucht. Von diesen wurden 136 Stämme in die ECOR-Gruppe A eingruppiert, 62 in Gruppe B1, 20 in Gruppe B2 und 14 in Gruppe D. Diese wurden auf das Vorhandensein von insgesamt acht Virulenzgenen tierpathogener *E. coli*, die vor allem charakteristisch für Kuh- und Schweine-pathogene *E. coli* sind, hin untersucht. Die Virulenz-assoziierten Gene tierpathogener *E. coli* kodieren alle für Adhäsine und wurden in 21 Stämmen (9,5 % aller Isolate) gefunden. Das heißt andererseits, dass 90,5% der Mastitis-Isolate keines dieser Virulenzgene enthielten. Adhäsingene Kuh- und Schweinepathogener *E. coli*-Isolate ließen sich in 16 Isolaten der ECOR-Gruppe A, aber auch in drei Isolaten der

ECOR-Gruppe B1, bzw. in zwei Stämmen der der ECOR-Gruppe D2, aber nicht in ECOR-Gruppe B2 nachweisen.

Von den Adhäsingenen charakteristisch für Kuh- und Schweine-pathogene Isolate wurde die F17-Fimbriendeterminante am häufigsten (5,8 %) detektiert, gefolgt von den *afa8* und *afa7*-Genen, die mit einer Häufigkeit von 2,2 % bzw. 1,8 % in den Stämmen gefunden wurden. Die Gene für die K88-, K99-, F41-, 987P- und F18-Adhäsine konnten in den Mastitis-Isolaten nicht nachgewiesen werden.

Bemerkenswert ist zu sehen, dass die Determinante für F17-Fimbrien in einem Stamm als einziges Virulenzgencluster nachgewiesen wurde im Gegensatz zu dem kombinierten Vorkommen der anderen tierpathogenen Virulenzgene.

Tab. 19 : Prävalenz der charakteristischen Adhäsingene Kuh- und Schweine-pathogener *E. coli*, in *E. coli*-Isolaten boviner Mastitiden

VF-Gene pro Stamm (von 42 ges.)	Genetische Komposition der VF-Gene	Anteil der positiv getesteten Stämme		VF-Gene pro Stamm (von 42 ges.)			
		Anzahl	F17	K88, K99, F41, 987P, F18	<i>afa8</i>	<i>afa7</i>	%
	alle 42 geprüften VF	222					
	keine tierpathogene VF	201	0	0	0	0	(90,5)
	8 tierpathogene VF	21	13 (5,8%)	0	5 (2,2%)	4 (1,8%)	(9,5)
1 VF-Gen	F17 als alleiniger VF	1	1				
2 VF-Gene	F17 , <i>fimH</i>	4	4				
	F17 , <i>traT</i>	1	1				
	afa7 , <i>fimH</i>	4				4	
3 VF-Gene	F17 , <i>fimH</i> , <i>hlyA</i>	2	2				
	afa8 , <i>fimH</i> , <i>fyuA</i>	1			1		
	afa8 , <i>traT</i> , <i>fyuA</i>	1			1		
4 VF-Gene	F17 , afa8 , <i>iroN</i> , <i>iss</i>	1	1		1		
	F17 , <i>fimH</i> , <i>traT</i> , <i>iss</i>	1	1				
5/6 VF-Gene	F17 , <i>fimH</i> , <i>gafD</i> , <i>cdtB</i> , <i>fyuA</i>	1	1				
	afa7 , <i>fimH</i> , <i>rfe</i> , <i>traT</i> , <i>hlyA</i>	1					
	F17 , <i>fimH</i> , <i>gafD</i> , <i>traT</i> , <i>cdtB</i> , <i>iutA</i>	1					
	F17 , <i>fimH</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>kpsMT</i>	1	1				
	K5, <i>iss</i> , afa8 , <i>fimH</i> , <i>bmaE</i> , <i>traT</i> , <i>iutA</i>	1	1		1		

VF-Gene pro Stamm (von 42 ges.)	Genetische Komposition der VF-Gene	Zugehörigkeit zu ECOR-Gruppe Anzahl bzw. Anteil an der Gesamtzahl der untersuchten Isolate			
		A	B1	B2	D
	alle 42 geprüften VF	136/222 (61,3%)	62/222 (27,9%)	10/222 (4,5%)	14/222 (6,3%)
	keine tierpathogene VF	120/201 (59,7%)	59/201 (29,3%)	10/201 (5,0%)	12/201 (6,0%)
	8 tierpathogene VF	16/21 (76,2%)	3/21 (14,2%)	0/21 (0%)	2/21 (9,5%)
1 VF-Gen	F17 als alleiniger VF	1			
2 VF-Gene	F17 , <i>fimH</i> F17 , <i>traT</i> <i>afa7</i> , <i>fimH</i>	4 1 2	2		
3 VF-Gene	F17 , <i>fimH</i> , <i>hlyA</i> <i>afa8</i> , <i>fimH</i> , <i>fyuA</i> <i>afa8</i> , <i>traT</i> , <i>fyuA</i>	2 1 1			
4 VF-Gene	F17 , <i>afa8</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> F17 , <i>fimH</i> , <i>traT</i> , <i>iss</i>	1 1			
5/6 VF-Gene	F17 , <i>fimH</i> , <i>gafD</i> , <i>cdtB</i> , <i>fyuA</i> <i>afa7</i> , <i>fimH</i> , <i>rfe</i> , <i>traT</i> , <i>hlyA</i> F17 , <i>fimH</i> , <i>gafD</i> , <i>traT</i> , <i>cdtB</i> , <i>iutA</i> F17 , <i>fimH</i> , <i>kpsMTII</i> , <i>kpsMTK5</i> , <i>iss</i> , <i>afa8</i> , <i>fimH</i> , <i>bmaE</i> , <i>traT</i> , <i>iutA</i>	1 1	1		1 1

4. Diskussion

Unter den Erregern bakterieller Infektionen ist *Escherichia coli* einer der vielseitigsten und gleichzeitig am besten untersuchten Organismen. Einerseits ist er als apathogener kommensaler Bewohner des intestinalen Traktes ein wichtiges Untersuchungsobjekt innerhalb der physiologischen Flora. Andererseits kann *E. coli* eine Reihe von intestinalen und extraintestinalen Infektionen verursachen. Neben den harmlosen Varianten, die auch als „Arbeitspferde“ der Molekularbiologie eine überragende Bedeutung erlangt haben (und als Wirtszellen in der untersten gentechnischen Risikogruppe eingeordnet wurden), existieren hochvirulente Pathotypen, welche im Säugetier verschiedene, teils lebensbedrohliche Infektionen auslösen können (Hacker und Kaper, 1999). Ursache dieses enorm weiten Spektrums in der Pathogenität der Spezies *E. coli* ist ein extrem dynamisches, flexibles System des Einbaus und Verlustes von mobilen genetischen Elementen, die für verschiedene Virulenzfaktoren kodieren. Auf Basis des sich ständig verändernden Genomgehaltes gelingt es *E. coli* in kürzester Zeit, sich seinem jeweiligen Wirtsorganismus und dort ganz unterschiedlichen Habitaten anzupassen (Hacker et al. 1990, Blum et al., 1994; Hacker und Kaper, 1999, Kaper et al. 2004). Die extraintestinalen Isolate unterscheiden sich teilweise deutlich von denen ursprünglicher Herkunft aus dem intestinalen Trakt.

Humanmedizinische und veterinärmedizinische wichtige *E. coli*-Infektionen betreffen als Wirtsorganismen den Menschen, das Rind, das Schwein und Geflügel. Dabei sind nicht nur die Übergänge von *E. coli* in die verschiedenen Habitate innerhalb einer Wirtspezies bzw. eines Organismus von Bedeutung: z.B. stellen durch *E. coli* verursachte Harnwegsinfektionen die häufigste bakterielle Infektion in den entwickelten Ländern dar. Auch die Übertragung von humanpathogenen *E. coli* auf andere Säuger bzw. umgekehrt von *E. coli*-Stämmen insbesondere der Nutztiere auf den Menschen ist relevant. So sind die seit 1982 auftretenden enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) in ihrem Ursprung kommensal in Rindern. EHEC-Stämme besitzen eine Reihe spezifischer Virulenzfaktoren, die von einem ganzen Spektrum mobiler genetischer Elemente kodiert werden: Bakteriophagen kodieren Toxine, Plasmide kodieren Hämolysine und Pathogenitätsinseln kodieren Eisenaufnahmesysteme, Invasine und Adhäsine. Die molekulare Analyse der beteiligten Gene und ihrer Proteinprodukte hat

aber auch ergeben, dass extraintestinale Infektionen und intestinale Infektionen auslösende *E. coli*-Bakterien gemeinsame Pathogenitätsfaktoren ausbilden können. Sie besitzen identische mobile Elemente. Die Virulenz-assoziierten Gene, die man sowohl bei ExPEC- und z.B. bei EHEC-Stämmen nachweisen kann, sind *cdt* (Toxin), *iroN-B* (Eisenaufnahme), die HPI (Eisenaufnahme), *sfa/foc* und *prf* (S/F1C- bzw. P-Fimbrienadhäsine), und *pic* (Serinprotease) (Hacker, 2006).

Die molekulare Analyse der mobilen genetischen Elemente, die u. a. einzelne Virulenzgene und ganze Virulenzgen-Cluster enthalten können (neben z. B. Antibiotikaresistenzen), erbrachte die Erkenntnis, dass nicht das gesamte *E. coli*-Genom hochvariabel und austauschbar ist. Vielmehr verfügt jedes *E. coli*-Bakterium über einen konservierten Teil seines Genoms (core genome). Dieser umfasst alle die Gene, die für die grundlegenden zellulären Prozesse essentiell sind, d. h. das core genome hat eine konstante Größe. Die unterschiedlichen pathogenen Phänotypen beruhen auf unterschiedlichen Genkombinationen, die für die Virulenzfaktoren kodieren. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Arten pathogener *E. coli* hinsichtlich der Größe ihres Genoms, d. h. in der Art und Anzahl ihrer chromosomal integrierten und inkorporierten mobilen genetischen Elemente.

Die Genomplastizität beruht dabei auf der Grundlage von Punktmutation und Rekombination, wobei fremde DNA meist durch horizontalen Gentransfer integriert wird. Dies erfolgt durch die Aufnahme mobiler Elemente mittels Phagen, Plasmiden oder genomischen Inseln (Nataro und Kasper, 1998; Ochmann und Jones, 1999; Dobrindt et al. 2004). Aber auch DNA-Rearrangements und Deletionen sind Möglichkeiten für eine Neukombination des bakteriellen Genoms.

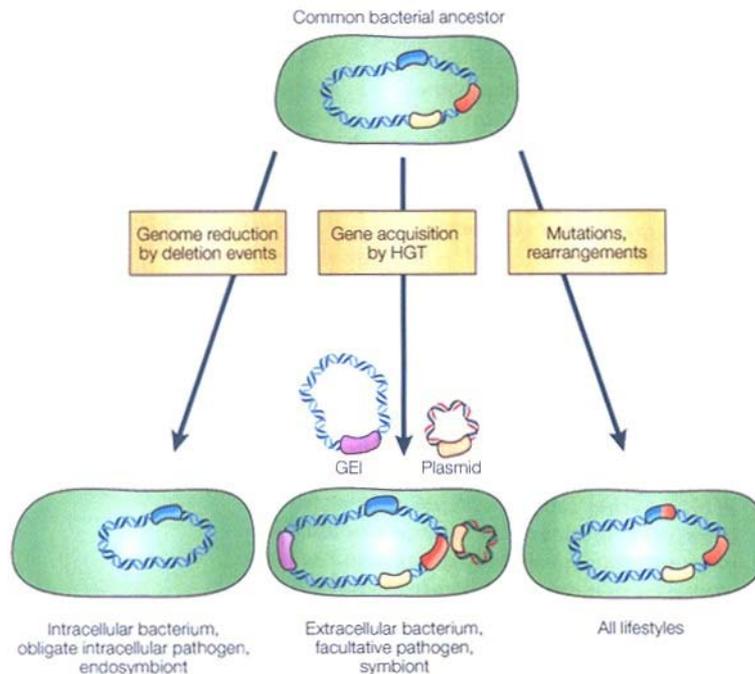


Abb. 8: Evolution der bakterieller Varianten durch Acquisition und Verlust genetischer Information (Dobrindt, U. et al., 2004)

Andere mobile Elemente, wie Transposons und IS Elemente, tragen ebenfalls zur Genomplastizität bei, sind jedoch beim horizontalen Gentransfer auf Transportvehikel angewiesen, um von einer Zelle zur anderen zu gelangen. Auf diese Weise wird die Vielfalt von Virulenzfaktoren weiter gesteigert.

Ein weiterer Einfluss auf die Pathogenität der Bakterien ebteht durch Verlust von DNA. Bei diesem Vorgang können z. B. ein Virulenzrepressor (Steigerung) oder Virulenzgene selbst (Verminderung) betroffen sein (Nakata et al., 1993; Maurelli et al., 1998).

Die Gesamtheit der mobilen Elemente verleiht somit dem Genom eine hohe Dynamik. Die molekulare Analyse dieser Vorgänge in Kombination mit molekularer Epidemiologie hat sich zu einem entscheidenden Werkzeug der Diagnostik, der Entwicklung neuer Therapieformen und der Prophylaxe entwickelt. Als innovative Methode ist der Nachweis der genetischen Variabilität mittels Multiplex-PCR-Analyse für die Bestimmung des molekularen Potentials an Virulenzfaktoren in klinischen Isolaten etabliert worden. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der molekular-epidemiologischen Analyse von Virulenzgenen im Genom von insgesamt 222 extraintestinalen *E. coli*-Isolaten dargestellt, die von Mastitis-Fällen bei Rindern isoliert

worden sind. Die Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion erlaubte die Analyse von gleichzeitig 42 potentiellen Virulenzfaktor-Genen extraintestinal pathogener sowie Kuh- und Schweine-pathogener *E. coli*. Damit war die Voraussetzung gegeben, die beschriebene Dynamik des *E. coli*-Genoms hinsichtlich einer Vielzahl relevanter Pathogenitätsfaktoren zu untersuchen. Neben der quantitativen Bestimmung des Vorkommens jedes Einzelgens wurde daher in dieser Arbeit eine differenzierte Auswertung von Genkombinationen vorgenommen, die zur Beschreibung von Virulenzfaktor-Mustern führte. Die Prävalenz des Auftretens von Mastitis-assoziierten Virulenzfaktormustern, d. h. auch der Gen-Kombinationen bei den *E. coli*-Erregern sollte erlauben, die Faktoren mit der wahrscheinlich höchsten Relevanz in der Pathogenese deutlicher zu identifizieren. Die genetischen Muster wurden

1. zur Prävalenz der in der Gesamtheit der Isolate,
2. zur Prävalenz in den phylogenetischen ECOR-Gruppen,
3. zu akut klinischen und chronischen Mastitis-Episoden und
4. zum Vorkommen spezifisch tierpathogener Adhäsine korreliert.

Die Bestimmung von genetischen Mustern von Virulenzfaktoren, die sich auf die Analyse des Erregers *E. coli* beschränkt, kann eine molekulare Untersuchung der Rolle der einzelnen Faktoren im Pathogenitätsmechanismus nicht ersetzen. Aus der genetischen Analyse sind Schlüsse auf die tatsächliche quantitative Expression der untersuchten Pathogenitätsfaktoren unter den Bedingungen des Erregerwachstums in Milchdrüsengewebe der Milchkühe nicht möglich. Sie würden aufwendige histologische und Serumanalysen erfordern, die systematisch über den gesamten Zeitraum einer Mastitisepisode vorgenommen werden und auch die Wirtsfaktoren (Abwehrreaktionen) einschließen müssten. Neben der qualitativen und quantitativen Bildung der Pathogenitätsfaktoren ist die Lokalisation der Expression im Gewebe zu berücksichtigen. Der Nachweis der in dieser Arbeit einbezogenen Virulenz-assoziierten Gene erlaubt noch keine Aussage über die Funktionalität der kodierten Faktoren.

Trotz dieser Einschränkungen hat sich im Ergebnis gezeigt, dass breit gefächerte molekulare epidemiologische Analysen, die dank der Multiplex-Technologie, verbunden mit der Zuordnung der Isolate zu den phylogenetischen Entwicklungslinien von *E. coli*, möglich geworden sind, wertvolle Anhaltspunkte liefern können zur Beurteilung der Bedeutung verschiedener Virulenzfaktoren für das Infektionsgeschehen.

Die in dieser Arbeit vorgenommene differenzierte quantitative Bestimmung von Genkombinationen und –mustern hat die Zuverlässigkeit verbessert, Mastitis-assoziierte Virulenzfaktoren bei *E. coli*-Erregern zu identifizieren.

4.1. Auswertung der Gesamtanalyse

Prävalenz von Virulenzfaktoren extraintestinal pathogener *Escherichia coli*-Stämme bei Isolaten boviner Mastitiden

Insgesamt 222 *E. coli*- Isolate boviner Mastitiden wurden auf das Vorkommen von 42 Virulenz-assoziierten Genen human- bzw. tierpathogener *E. coli* mittels Multiplex-PCR untersucht.

Alle 222 Mastitis-Isolate wurden auf ihre Zugehörigkeit zu den phylogenetischen ECOR-Gruppen A, B1, B2 und D getestet. Die Ergebnisse aller Isolate sind zusammengefasst in zwei Tabellen: Tab. 7 zeigt die Prävalenz der Virulenzfaktorgene in 222 Isolaten. Tab. 8 stellt die Häufigkeit von Genkombinationen als jeweiliges Muster an Virulenzfaktoren dar.

Das absolut häufigste Virulenz-assoziierte Gen, das nachgewiesen wurde, war das für die mannosespezifische Adhäsionseinheit der Typ1-Fimbrien kodierende Gen *fimH*. Typ 1-Fimbrien könnten nach diesem Ergebnis im Infektionsprozess eine wichtige, sogar entscheidende Rolle spielen. Insgesamt gaben 88,7 % aller 222 untersuchten Stämme ein positives Signal für *fimH* in der Multiplex-PCR. Von den 199 klinischen Isolaten waren 89,9 % *fimH*-positiv, von den Isolaten chronischer Fälle waren 85,7 % *fimH*-positiv (Tab. 7, Kap. 3). In 74 Stämmen (33,3 % aller Isolate) wurde das Gen *fimH* als alleiniges Virulenzgen von allen 42 in die Untersuchung einbezogenen Genen nachgewiesen. Kein anderer Virulenzfaktor wurde auch nur annähernd mit derart hoher Frequenz als singuläres Gen gefunden (Tab. 8, Kap. 3). Aber auch bei Stämmen, die nur zwei Virulenzfaktorgene enthielten, wurde *fimH* in 63 von 69 Isolaten nachgewiesen (Tab. 8, Kap. 3). In allen anderen Stämmen, die drei und mehr Virulenzfaktoren kodierten, war *fimH* zu 100 % präsent (Tab. 8, Kap. 3). Insgesamt bestätigt dieses Ergebnis die schon bei anderen *E. coli*-Isolaten nachgewiesene starke Prävalenz des

fimH-Gens auch für die veterinärmedizinisch wichtigen Mastitis-Fälle bei Rindern. Das Gencluster für Typ 1-Fimbrien wurde in fast allen pathogenen und apathogenen *E. coli*-Varianten nachgewiesen. Auch bei extraintestinalen Infektionen wurde die Beteiligung der Typ 1-Fimbrien am Infektionsmechanismus bestätigt. Ob Typ 1-Fimbrien auch eine relevante Funktion bei der Entstehung boviner Mastitiden haben, muß zukünftig geklärt werden.

Sehr häufig, in ca. der Hälfte (43,7 %) aller untersuchten Stämme, trat auch das Gen *traT* auf, das an der Serumresistenz von *E. coli* beteiligt ist (Tab. 7, Kap. 3). Im Gegensatz zu *fimH* konnte es jedoch nur in sehr geringer Frequenz als alleiniges Virulenzgen nachgewiesen werden (7 Stämme; 3,1 %). Interessanterweise wurde deutlich häufiger (43 Stämme; 19,3 %) *traT* zusammen mit *fimH* in Stämmen gefunden, die nur diese beiden Virulenzfaktoren als Zweierkombination im Genom integriert hatten (Tab. 8, Kap. 3). Insgesamt ergaben die Untersuchungen, von wenigen Ausnahmen abgesehen (*traT*, *hlyA* und *fyuA*) bei insgesamt drei Stämmen (Tab. 8, Kap. 3), einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des Serumresistenz-Genes *traT* und dem *fimH* Gen bei weiteren 30 Stämmen, die mehr als zwei Virulenzfaktor-Gene enthielten (11,3 %). Die Genkombination *fimH-traT* wurde insgesamt in 83 Stämmen (37,3 %) gefunden. Sie steht damit in weitem Abstand an der Spitze aller mehrfachen Virulenzgenkombinationen. Da bei Rinder-Mastitis besonders in den schweren Fällen (die Infektion kann letal verlaufen) systemische Verläufe fördernde Faktoren wie Serumresistenz eine bedeutende Rolle spielen, könnte hier eine Selektion auf genetische Kopplung der entsprechenden Gene mit denen der Typ 1-Fimbrien vorliegen.

Deutlich geringere Prävalenzen in ca. 1/10 der geprüften Stämme wiesen die Determinanten für Virulenzfaktoren wie dem α -Hämolysin (*hlyA*, 10,8 %), dem Siderophor Yersiniabactin (*fyuA*, 12,2 %) sowie das ebenfalls an der Serumresistenz beteiligte Gen *iss* (8,5 %) auf. Das Iss-Protein gehört neben den F17-Fimbrien zu den Faktoren, die als alleinige VF auftraten, allerdings nur in jeweils einem Stamm. Dennoch wird hier abermals die Bedeutung des Zusammenspiels von Adhäsion- und Serumresistenzgenen bestätigt.

Das Toxin α -Hämolysin-kodierende Gen *hlyA*, wurde in 24 Stämmen (10,8 %) zusammen mit einem positiven *fimH*-Signal nachgewiesen. Auch phänotypisch waren

diese Stämme hämolytisch. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, dass das *hly*-Gencluster häufig in chromosomal räumlicher Nähe eines P-Fimbrienclusters zu finden ist und durch Deletion eliminiert werden kann (Hacker und Mühldorfer, 1994). Das *hlyA*-Gen konnte in nur 3 Stämmen zusammen mit den *pap*-Genen nachgewiesen werden (Tab. 18, Kap. 3).

Die Eisenaufnahme scheint insgesamt mit den Siderophorsystemen Yersiniabactin (repräsentiert durch *fyuA*; Prävalenz 12,2 %), Aerobaktin (repräsentiert durch *iutA*; Prävalenz 6,3 %) und Salmochelin (repräsentiert durch *iroN*; Prävalenz 5,5 %) für die Pathogenese der Rindermastitis eine größere Rolle zu spielen, da hier ein additiver Beitrag aller Transporter (24,1 %) in Betracht gezogen werden muss. Die entsprechenden Gene kommen in der Regel nur einmal pro Genom vor. Sogar in den Virulenzfaktor-Genkombinationen mit mindestens vier Faktoren traten die Eisenaufnahmesysteme nicht gemeinsam auf.

Das einzige Adhäsion tierpathogener *E. coli*, das mit einer Häufigkeit in den untersuchten Isolaten von 5,8 % in Erscheinung trat, waren die F17-Fimbrien.

Die Kapselsynthese insgesamt scheint von der Häufigkeit der Synthesegene her gesehen eher weniger bedeutungsvoll für die Etablierung einer Mastitis zu sein. Allein die Gene *kpsMTII* der Gruppe II-Kapseln wurden in 4,9 % der Mastitis-Isolate detektiert. Kapseln tragen wahrscheinlich zur Serumresistenz bei und erschweren allgemein die Detektion durch das Immunsystem (Avery et al. 1944, Wessels et al., 1987). Ebenso vergleichsweise gering ist die Frequenz der beiden neben dem α -Hämolyysin untersuchten Toxine CNF-1 (cytotoxic necrotising factor; Prävalenz 2,3 %) und CDT (cytolethal distending toxin; Prävalenz 2,7 %). Der Beitrag dieser beiden Toxine zur Ausprägung der Mastitis bei Rindern wird daher im Gegensatz zum α -Hämolyysin als relativ gering bewertet.

Die vom *pap*-Gencluster kodierten Fimbrien als Einzelgene (Tab. 7, Kap. 3) konnten ebenfalls nur mit einer relativ geringen Frequenz (0,4 - 3,6 %) detektiert werden. Zudem wurden sie gemeinsam und nicht alternativ gefunden in den Stämmen, die 6 und mehr Virulenzfaktorgene enthielten (Tab. 18, Kap. 3.). Dadurch beschränkt sich ihre Häufigkeit bezogen auf das einzelne Isolat auf die Prävalenz der Einzelgene der *pap*-kodierten Fimbrien. Die in dieser Arbeit ermittelten Genkombinationen berücksichtigen

einen potentiellen Adhäsionsmechanismus, der über Typ I-Fimbrien und P-Fimbrien unterschiedliche Bereiche der Milchdrüse möglicherweise gleichzeitig betreffen kann.

Nur 13 (5,8 %) der 222 *E. coli*-Isolate besaßen keinen von den untersuchten 42 Virulenzfaktoren. Obwohl dieser Anteil einen geringen Prozentsatz darstellt, ist dieser Befund in zweierlei Hinsicht wichtig: Einmal sind offensichtlich mit den 42 geprüften Virulenzfaktor-Genen die wesentlichen Virulenz-assoziierten Faktoren extraintestinal pathogener *E. coli* in die Analyse einbezogen worden. Dennoch könnten noch weitere unbekannte bzw. unberücksichtigte Faktoren eine Rolle spielen. Das Fehlen multipler Virulenzfaktoren in bovinen *E. coli* Mastitis-Isolaten entspricht bereits publizierten Beobachtungen und ist mit individuellen Immunschwächen des Wirtsorganismus in Zusammenhang gebracht worden, wie sie mitunter als Folge von Viruserkrankungen auftreten. Die bovine *E. coli*-Mastitis könnte also in diesen Fällen auch aus dem spezifischen Wirtsstatus heraus erklärt werden (Burvenich et al., 2003).

Insgesamt acht der untersuchten 42 Virulenzdeterminanten (*papG* Allel II/III, *nfa*, *afa/draBC* sowie die für die K88-, K99-, F41-, 987P- und F18-Fimbrien kodierenden Gene tierpathogener *E. coli* kamen in den untersuchten 222 Isolaten nicht vor. Auffällig ist, dass fünf dieser Gene Adhäsine von spezifisch tierpathogenen Isolaten repräsentieren. Diese Ergebnisse machen einen Infektionsweg vom Menschen auf die Kühe wahrscheinlich.

Aus der Analyse der Kombinationen der Virulenzgene (Tab. 8, Kap. 3) ergibt sich der klare und interessante Befund, dass die Mehrzahl der Stämme einen singulären Virulenzfaktor (83 Stämme; 37,4 %), eine Zweierkombination (14 Muster) von Virulenzgenen (69 Stämme; 31,1 %) oder eine Dreierkombination (15 Muster) von Virulenzgenen (34 Stämme; 15,3 %) aufweisen. Vier Virulenzgene in fünf Kombinationen (= 5 Muster) gleichzeitig zeigten sich lediglich in sieben Stämmen (3,1 %). Insbesondere die Virulenzgenkombinationen für 5 bis 18 differente Faktoren in einem Genom traten als spezifisches Muster nur jeweils einmal auf. Diese Kombinationen wurden mit einer geringen Frequenz in zusammen 16 Isolaten (6,8 %) jeweils in unterschiedlichen Kombinationen in 15 unabhängigen Stämmen, d. h. in 15 individuellen Mustern nachgewiesen (Tab. 8, Kap. 3). Offensichtlich ist die Beteiligung von Pathogenitätsinseln bzw. das gehäufte Auftreten von verschiedenen Virulenzfaktoren in *E. coli* für die Pathogenese der Rindermastitis von untergeordneter

Bedeutung. Der Besitz von *fimH* allein und/oder ein bis zwei weiteren Virulenzfaktoren (bevorzugt *traT*) scheint für das Infektionsgeschehen auszureichen.

4.2. Prävalenz der Virulenzfaktoren in den phylogenetischen ECOR-Gruppen

Die Untersuchungen der Mastitis-assoziierten *E. coli*-Isolate entsprechend ihrer phylogenetischen Herkunft ist in Tab. 10-17, Kap. 3 detailliert dargestellt. Die Prüfung der ECOR-Gruppen ergab, dass von den untersuchten 222 Isolaten insgesamt 137 Stämme zur Gruppe A gezählt werden, 62 zur Gruppe B1, 20 zur Gruppe B2 und 14 zur Gruppe D. Nach der veterinärmedizinischen Charakterisierung der mit den Isolaten assoziierten Mastitis wurde eine weitere Unterteilung der Gruppen in klinisch und chronisch und subklinisch vorgenommen (Tab. 10-17, Kap. 3).

Repräsentativ für die klinisch auffälligen Isolate der ECOR-Gruppe A waren 123 *E. coli* Stämme, von denen 10 Isolate keine Virulenzfaktoren zeigten (Tab. 10, Kap. 3). Mit 38,8 % war *fimH* als singuläres Virulenzgen am häufigsten vertreten, gefolgt von 14,8 % positiven Stämmen mit der *fimH-traT*-Genkombination. Die chronischen (12 Stämme; Tab. 11, Kap. 3) und subklinischen (2 Isolate; Tab. 12, Kap. 3) ECOR Gruppe A-Isolate können aufgrund der geringen Anzahl nicht für ein statistisches Ergebnis herangezogen werden. Innerhalb der ECOR-Gruppe A wurden 2 subklinische Stämme untersucht, die jeweils mit einem singulären Virulenzgen, nämlich *fimH* und der F17-Fimbriendeterminante vertreten waren (Tab. 12, Kap. 3).

54 Isolate akuter Mastitiden wurden in die ECOR-Gruppe B1 eingeordnet (Tab. 13, Kap. 3). Auch hier war das singuläre Gen *fimH* mit einer Prävalenz von 44,4 % das am häufigsten nachgewiesene Virulenz-assoziierte Gen. Außerdem waren *fimH* und *traT* als gleichzeitig nachgewiesene Virulenzgene mit einer Häufigkeit von 25,9 % wiederum die mit deutlichem Abstand häufigste Virulenzgenkombination. 12 Isolate chronischer Mastitiden gehörten zur ECOR-Gruppe A. Diese Gruppe beinhaltete drei Stämme, welche die *fimH-traT*-Genkombination aufwiesen. Diese wurde auch bei vier von den insgesamt acht ECOR-B1-Stämmen aus chronischen Mastitiden nachgewiesen (Tab. 14, Kap. 3). In der ECOR-Gruppe D wurden nur Isolate klinischer Mastitis-Fälle eingeordnet (Tab. 17, Kap. 3). Wiederum war die Fallzahl (13 Stämme) zu klein für

eine repräsentative Auswertung: Je ein Stamm trug ein singuläres *fimH* bzw. *traT*-Gen, drei Stämme zeigten die *fimH-traT*-Zweierkombination. Insgesamt wies die Gruppe keine Auffälligkeiten bei den Verteilungsmustern auf.

Abweichend hiervon zeigten die Untersuchungen der ECOR-B2-Gruppe eine auffällig hohe Anzahl an Virulenzfaktor-Genkombinationen mit mehr als vier Virulenz-assoziierten Genen. Die Untersuchungen der insgesamt neun Isolate akuter Mastitiden zeigte ein Vorkommen multipler Virulenzgene in sieben Isolaten (Tab. 15, Kap. 3). Dabei enthielten diese Stämme zwischen sechs und 18 der untersuchten Virulenzgene. In nur zwei Fällen waren identische Genkombinationen detektierbar (im Fall von zwei Stämmen mit sechs Virulenzgenen). Für die Untersuchung der ECOR B2-Stämme aus chronischen Mastitiden stand nur ein Stamm zur Verfügung, der mit 12 VF-Genen ebenfalls eine hohe Genanzahl repräsentierte (Tab. 16, Kap. 3). Obwohl die Fallzahl von neun ECOR B2-Isolaten aus klinischen Mastitiden eigentlich keine statistisch gesicherte Aussage im Vergleich zulässt, zeigte sich in dieser Gruppe doch eine dermaßen deutliche Dominanz von Virulenzfaktor-Genclustern, dass an dieser Stelle kein Zufallsbefund vermutet wird. Wenn Isolate der ECOR-Gruppe B2 eine Mastitis auslösen konnten, handelte es sich dabei offensichtlich um solche, die aufgrund einer Vielzahl charakteristischer Virulenz-assoziiertes Gene ein hohes Virulenzpotential besaßen. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die meisten der untersuchten Virulenzgene charakteristisch für die ECOR-Gruppe B2 sind.

Dieses Ergebnis der erhöhten Frequenz des Auftretens von Virulenzfaktor-Genclustern speziell in der ECOR-Gruppe B2 wird gestützt durch eine Untersuchung des Colibactin Polyketid/Nicht-ribosomalen Peptid-kodierenden Genclusters von *E. coli*. Dieses Polyketid-Gencluster wurde mit ganz wenigen Ausnahmen nur in ECOR-Gruppe B2-Isolaten nachgewiesen, in diesem Fall zu 97 % in extraintestinal pathogenen *E. coli*. Der Colibactin-Biosynthesepathway wird von einer 55-kb großen "Genomischen Insel" (GEI) kodiert, die für multiple putative Hybrid-Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) kodiert (Nougayréde et al., 2006; Putze et al., 2009).

Die Gencluster für die Eisenaufnahmesysteme Yersiniabaktin, Aerobaktin und Salmochelin konnten in den ECOR-Gruppen A und B1 nicht in der Dreierkombination

nachgewiesen werden, sondern traten zufällig singular oder in Zweierkombinationen auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die in dieser Untersuchung analysierten phylogenetischen ECOR-Gruppen A, B1 und D hinsichtlich der Prävalenz der Virulenzfaktor-Muster praktisch nicht vom allgemeinen Trend unterschieden (siehe Gesamtanalyse). Lediglich die Isolate der ECOR-Gruppe B2 wiesen die sonst eher selten nachgewiesenen Virulenzfaktor-Gencluster in charakteristischer Häufigkeit auf (Johnson et al., 2008, Le Gall et al., 2007).

4.3. Prävalenz der tierspezifischen Virulenzfaktoren in den ECOR-Gruppen

In die Untersuchungen wurden insgesamt acht Determinanten für tierspezifische Virulenzfaktoren einbezogen, die für verschiedene Adhäsine überwiegend Rind- und Schweine-pathogener *E. coli* kodieren, nämlich F17-, K88-, K99-, F41-, 987P-, F18-Fimbrien sowie die Nichtfimbrienadhäsine, Afa8 und Afa7 (Tab.19, Kap. 3). Von der Gesamtanzahl der 222 *E. coli*-Stämme enthielten 21 (9,5 %) Vertreter dieser Adhäsindeterminanten. In 5,8 % aller Stämme war das F17-Fimbrien-Gencluster präsent. Bemerkenswert ist, dass in einem Stamm F17-Fimbrien als alleiniger Virulenzfaktor gefunden wurden. Bis auf eine Ausnahme (F17, *afa8*) traten diese „tierspezifischen“ Virulenzgene nur einzeln (entweder *F17*, *afa8* oder *afa7*) neben den anderen auch in humanpathogenen *E. coli* verbreiteten Virulenzgenen auf (Tab. 19, Kap. 3). Neben der erstaunlich geringen Frequenz des Vorkommens solcher für Tierpathogene charakteristischen Faktoren in den Mastitis-Isolaten ist wichtig festzustellen, dass fünf von den acht Adhäsingenen, K88, K99, F41, 987P und F18, nicht nachgewiesen werden konnten. Insgesamt zeichnet sich eine Dominanz der F17-Fimbrien (13 Stämme, 5,8 %) gegenüber den Nichtfimbrienadhäsinen Afa8 (5 Stämme, 2,2 %) und Afa7 (4 Stämme, 1,8 %) innerhalb dieser untersuchten Gruppe ab. Bis auf drei Ausnahmen traten F17, Afa8 und Afa7 in Kombination mit *fimH* auf (Tab. 19, Kap. 3). Die größte Untergruppe an Virulenzgenkombinationen sind Kombinationen von zwei Virulenzdeterminanten (9 von 21), wobei die Determinanten für F17-Fimbrien bzw. Afa7 (je 4 Stämme) dort stets zusammen mit *fimH* vorkamen.

Das relativ geringe Vorkommen bzw. weitgehende Fehlen (5 von 8) spezifischer Adhäsiogene Rind- und Schweine-pathogener *E. coli* sowie die vergleichsweise Dominanz der bekannten humanpathogenen Virulenz-assoziierten Gene lässt darauf schließen, dass eine bovine Mastitis wahrscheinlich vom Menschen ausgehend übertragen wird.

4.4. Analyse der *E. coli*-Isolate, die mit chronischer Mastitis assoziiert sind

Für die Analyse der chronischen Verlaufsform der Mastitis standen 21 Isolate zur Verfügung (Tab. 9, Kap. 3). Diese geringe Zahl erlaubt keinen hinreichend gesicherten Vergleich zu den Fällen, die mit akuter klinischer Mastitis assoziiert sind (199 Stämme insgesamt). Eine Reihe Besonderheiten sind bereits im Abschnitt „Prävalenz der Virulenzfaktoren in den phylogenetischen ECOR-Gruppen“ dargestellt worden. Zusätzlich ergaben sich noch folgende Auffälligkeiten: Die relative Häufigkeit bezogen auf die Gesamtanzahl der chronischen Isolate wird auch hier durch das Gen *fimH* bestimmt; es macht 85 % der nachgewiesenen Gene aus. Auch in dieser Gruppe ist *traT* mit 57 % das am zweithäufigsten nachgewiesene Virulenz-assoziierte Gen, das allerdings immer in Kombination (9 Muster) mit *fimH* zu finden ist (Tab. 9, Kap. 3). Die Kombination *fimH-traT* (28,6 % aller chronischen Isolate) stellt zusammen mit *fimH* als alleinigem Virulenzmarker (26,8 %) das häufigste Genmuster dar.

Eine interessante Auffälligkeit (Tab. 9, Kap. 3) war die deutlich erhöhte Frequenz des Auftretens des Hämolyisins *hlyA* (23,8 %) gegenüber 9,5% in den Isolaten aus klinischen Mastitiden (und 10,8 % in allen Stämmen). Auch hier lässt die geringe Zahl der mit chronischer Mastitis assoziierten Stämme keinen gesicherten Schluss zu. Es wäre aber interessant, bei Verfügung über mehr gesicherte chronische Mastitis-assoziierte Isolate diese Auffälligkeit weiter zu verfolgen.

4.5. Abschließende Diskussion und praktische Konsequenzen

Die Multiplex-PCR-Untersuchungen ausgewählter Virulenzfaktoren bei 222 *E. coli* - Stämme aus bovinen Mastitiden erlaubte keine Beschreibung eines Mastitis-spezifischen *E. coli* Pathotyps, der durch einen bestimmten Virulenzgehalt

charakterisiert wird. Typische Virulenz-assoziierte Gene extraintestinal pathogener und tierpathogener *E. coli* wurden insgesamt nur mit geringer Häufigkeit in den Isolaten nachgewiesen. Dieses wird auch durch die Ermittlung der phylogenetischen Entwicklungslinien der untersuchten Mastitis-Isolate unterstrichen. Eine eindeutige Zuordnung zu einer ECOR-Gruppe war nicht möglich. Ein erhöhtes Vorkommen an Stämmen der ECOR-Gruppe B2 unter den 222 Isolaten konnte nicht gefunden werden (insgesamt 10 Stämme, 9 klinisch, 1 chronisch). Zusammen machten sie 4,5 % der Isolate aus, gegenüber 137 Stämmen (61,7 %) der Gruppe A (123 klinisch, 12 chronisch, 2 subklinisch), 62 Stämmen (27,9 %) der Gruppe B1 (54 klinisch, 8 chronisch) und 13 Stämmen (5,8 %) der Gruppe D (13 klinisch). Im Gesamtgeschehen erwiesen sich die mit wenigen ExPEC-Virulenzfaktoren ausgestatteten Stämme der phylogenetischen Gruppen A und B1 als absolut dominant (Tab. 10-14, Kap. 3). Diese Beobachtung schließt aus, dass Mastitis, als eine Infektion außerhalb des Intestinaltraktes, durch charakteristische Vertreter extraintestinal pathogener *E. coli* ausgelöst wird. Die zahlenmäßig häufigsten Isolate wiesen keine oder nur sehr wenig ExPEC-Virulenzgene auf und ähneln auch aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den ECOR-Gruppen A und B1 kommensalen *E. coli*-Varianten.

Charakteristische Virulenzmarker Kuh-pathogener *E. coli* wurden ebenfalls sehr selten nachgewiesen. Insgesamt wurden überwiegend Virulenz-assoziierte Gene humanpathogener *E. coli* detektiert. Adhäsine tierpathogener *E. coli* traten nur in 9,5% der Isolate auf (Tab. 19, Kap. 3).

In den Mastitis-Isolaten wurde eine hohe Prävalenz der Typ 1-Fimbrien-Determinante in Kombination mit Serumresistenz-assoziierten Genen festgestellt. Typ 1-Fimbrien sind Bestandteile der Zelloberfläche von *E. coli* und ermöglichen die spezifische Rezeptor-vermittelte Adhäsion an andere Organismen und Gewebe. Die Adhäsion stellt den ersten Schritt der Infektion einer Nische durch *E. coli* dar (Connell et al., 1996; Khan et al., 2007). Bei ExPEC stellen Typ 1-Fimbrien einen wichtigen Virulenzfaktor dar und beeinflussen den Grad der Pathogenität. Serumresistenz könnte für das Überleben in der Milchdrüse im Verlauf der infektionsbedingten Wirtsreaktion von Bedeutung sein. Dabei waren keine Unterschiede zwischen chronischen und klinischen Mastitisverläufen zu erkennen. In beiden Fällen können Vorkommen und Häufigkeit der Virulenzfaktoren als annähernd gleich betrachtet werden.

Dass eine Infektion der Milchdrüse der untersuchten Tiere auch ohne die 42 getesteten Virulenzgene möglich ist, zeigte sich anhand 13 (5,4 %) *E. coli*-Stämme, in denen keines dieser Gene nachgewiesen werden konnte (Tab. 9, Kap. 3). Diese Stämme könnten eventuell weitere, nicht untersuchte Virulenzfaktoren exprimieren. Eine alternative Erklärung wäre, dass der immunologische Status der Rinder als Wirtsorganismen zum Zeitpunkt der Infektion eine bedeutsame Rolle spielt und in diesen Fällen spezifische bakterielle Virulenzfaktoren nicht erforderlich sind (Burvenich et al., 2003).

Begleitende Daten über das Stadium und Progression der Mastitiserkrankung zum Zeitpunkt der Isolation, Schwere der Erkrankung, Dauer der chronischen Erkrankungen sowie geografische Regionen der landwirtschaftlichen Betriebe, in denen die Proben isoliert wurden, lagen nicht vor und konnten daher in der Diskussion nicht berücksichtigt werden. Die Einarbeitung dieser Daten würde die Aussage über die Epidemiologie der durch *E. coli* verursachten Rindermastitis nochmals vertiefen.

Die Auswertung der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse führt zu zwei praktischen Folgerungen: a) Die *E. coli*-Mastitis bei Rindern kann durch eine Vielzahl an *E. coli*-Stämmen verursacht werden, die kein charakteristisches Virulenzgenmuster aufweisen. Es handelt sich dabei nicht um hochvirulente ExPEC, sondern eher um *E. coli*-Varianten mit geringem Virulenzpotential. b) Als mögliche Virulenz-assoziierte Faktoren bei der Rinder-Mastitis spielen wahrscheinlich Adhäsion über Typ 1-Fimbrien und Serumresistenz eine wichtige Rolle. Nachgeordnet wurden noch die Eisenaufnahmesysteme insgesamt häufiger nachgewiesen. Mittels spezifischer *fimH*- und *traT*-knock out-Mutanten könnte diese Aussage überprüft werden. Dazu wäre allerdings ein sehr aufwendiges *E. coli*-Mastitis-Infektionsmodell erforderlich. Angesichts der Tatsache, dass so genannte pathoadaptive Mutationen im *fimH*-Gen die Rezeptorspezifität und damit auch die Virulenz eines *E. coli*-Isolates beeinflussen können (Sokurenko et al., 1999, 2001; Harris et al., 2001; Hung et al., 2002; Weissman et al., 2003), wäre es interessant, zukünftig das Auftreten von Punktmutationen in *fimH* zu analysieren und mit der Pathogenität der Mastitis-Erreger zur korrelieren.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse könnten somit beitragen, prophylaktische bzw. therapeutische Ansätze gegen die von *E. coli* ausgelöste bovine Mastitis weiter zu verbessern.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der molekular-epidemiologischen Analyse von Virulenzgenen im Genom von insgesamt 222 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Isolaten dargestellt, die von Mastitis-Fällen bei Rindern isoliert wurden. Mit Hilfe der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion wurde die Verbreitung von 42 potentiellen Virulenzfaktor-Genen extraintestinal pathogener *E. coli* (ExPEC) analysiert. Neben der quantitativen Bestimmung des Vorkommens jedes Einzelgens wurde in dieser Arbeit eine differenzierte Auswertung von Genkombinationen bei *E. coli* Mastitis-Isolaten vorgenommen. Diese ermittelten genetischen Muster werden zur 1. Prävalenz der in der Gesamtheit der Isolate, 2. Prävalenz in den phylogenetischen ECOR-Gruppen, 3. akut klinischen und chronischen Mastitis-Episoden und 4. dem Vorkommen spezifisch tierpathogener Adhäsine korreliert.

Die Mastitis-Isolate konnten aufgrund der Virulenzmarkerverteilung und Phylogenie keinem bestimmten charakteristischen Pathotyp zugeordnet werden. Die überwiegende Mehrzahl der Mastitis-Isolate zeigte aufgrund einer geringen Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene sowie der Zugehörigkeit zu den phylogenetischen Entwicklungslinien A und B1 ein geringes Virulenzpotential extraintestinal pathogener *E. coli*.

Die Mehrzahl der Stämme enthielt eine singuläre Virulenzdeterminante (83 Stämme; 37,4 %), eine Zweierkombination (69 Stämme; 31,1 %) oder eine Dreierkombination von Virulenzgenen (34 Stämme; 15,3 %). Vier Gene für Virulenzfaktoren in Kombination zeigten sich lediglich in sieben Stämmen (3,1 %). Insbesondere die Anwesenheit von 5 bis 18 differenten Virulenzgenen pro Genom traten nur mit einer geringen Frequenz in zusammen 16 Isolaten (7,2 %) auf. Das absolut häufigste Virulenz-assoziierte Gen, das nachgewiesen wurde, war *fimH*, das für die mannosespezifische Adhäsineinheit der Typ1-Fimbrien kodiert. Insgesamt gaben 88,7 % aller 222 untersuchten Stämme ein positives Signal in der Multiplex-PCR, und zwar 89,9 % der 199 klinischen Isolate sowie 85,7 % der Isolate chronischer Mastitiden. In etwa der Hälfte aller untersuchten Stämme trat auch das Gen *traT* auf, das Serumresistenz vermittelt (43,7 %). Die Genkombination *fimH-traT* wurde in wechselnden Konstellationen in insgesamt 83 Stämmen (37,3 %) gefunden. Sie ist damit die häufigste Virulenzgenkombination in den untersuchten *E. coli*-Genomen mit

multiplen Virulenzdeterminanten. Da bei Rinder-Mastitis besonders in den schweren Fällen systemische Verläufe fördernde Faktoren wie Serumresistenz eine bedeutende Rolle spielen, könnte hier eine Selektion auf genetische Kopplung von *traT* mit *fimH* vorliegen. Deutlich geringere Prävalenzen wiesen die Virulenzgene für α -Hämolysin (*hlyA*, 10,8 %), den Yersiniabactinrezeptor (*fyuA*, 12,2 %) sowie das ebenfalls an der Serumresistenz beteiligte Gen *iss* (8,5 %) auf.

Nur 13 (5,8 %) der 222 *E. coli*-Isolate besaßen keines der untersuchten Virulenzgene. Das Fehlen bekannter Virulenzgene in diesen Stämmen deutet darauf hin, dass weitere unberücksichtigte Faktoren eine Rolle bei der Virulenz von Mastitisisolaten spielen könnten oder der Status des Wirtsorganismus in diesen Fällen ausschlaggebend für eine erfolgreiche Infektion des Euters sein könnte. Offensichtlich sind die meisten der untersuchten *E. coli*-Virulenzfaktoren für die Pathogenese der Rindermastitis von untergeordneter Bedeutung. Von den 222 Isolaten zählten insgesamt 137 Stämme zur phylogenetischen Linie (ECOR-Gruppe) A, 62 zur ECOR-Gruppe B1, 20 zur ECOR-Gruppe B2 und 14 zur Gruppe D. Die Stämme, die zu den phylogenetischen Entwicklungslinien A, B1 und D gehören, unterschieden sich hinsichtlich der Prävalenz der Virulenzfaktormuster nicht vom Gesamtbild. Lediglich Isolate der ECOR-Gruppe B2 wiesen eine für sie typische Häufung von Virulenzgenclustern auf.

Das relativ geringe Vorkommen bzw. weitgehende Fehlen (5 von 8) von Adhäsingenen spezifisch tierpathogener *E. coli* lässt darauf schließen, dass bislang beschriebenen Rinder-pathogenen *E. coli* keine Bedeutung als Verursacher einer Rindermastitis zukommt. Für die Analyse der chronischen Verlaufsform der Mastitis standen nur 21 Isolate zur Verfügung, die keinen hinreichend gesicherten Vergleich zu den Fällen mit akuter klinischer Mastitis (199 Stämme insgesamt) erlauben. Die auffällige Zunahme des Hämolysingens *hlyA* (23,8 %) gegenüber 9,5 % in den klinischen Isolaten (und 10,8 % in allen Stämmen) müsste in künftigen Untersuchungen invasiven Verhaltens der ExPEC beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine bovine Mastitis durch verschiedene *E. coli*-Varianten hervorgerufen werden kann und ein großes Potential extraintestinaler Virulenzfaktoren dazu nicht erforderlich ist. Entscheidend ist eine durch das *fimH*-Gen vermittelte Adhäsion, in der Hälfte der untersuchten Fälle unterstützt durch das Serumresistenz vermittelnde Gen *traT*.

6. Literaturverzeichnis

- **Achtman, M. et al. (1999)** *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 14043–14048.
- **Ahmed, N., Dobrindt, U., Hacker, J. and Hasnain, S.E. (2008)** Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention, *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 6, 387-394.
- **Amor, K., Heinrichs, D. E., Friedrich, E., Ziebell, K., Johnson, R. P. & Whitfield, C. (2000)** Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**, 1116–1124.
- **Annunziato PW, Wright LF, Vann WF, Silver RP. (1995)** Nucleotide sequence and genetic analysis of the *neuD* and *neuB* genes in region 2 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol.*; 177(2):312-9.
- **Arber W. (1993)** Evolution of prokaryotic genomes. *Gene*. Dec 15;135(1-2):49-56.
- **Avery O. et al (1944)** *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types*. *J. Experim. Med.* 79 (1944): 137–158
- **Bagg A, Neilands JB. (1987)** Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev.*; 51(4):509-18.
- **Bergthorsson U, Ochman H. (1998)** Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.*;15(1):6-16.
- **Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.*; 277(5331):1453-62.
- **Blum, G., Marre, R. & Hacker, J. (1995)** *Infection* **23**, 234–236.
- **Blum, G. et al. (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.
- **Bouquet, P. (2001)** The cytotoxic necrotizing factor 1 (*cnf 1*) from *Escherichia* *Toxicon*. Nov; 39(11):1673-1680
- **Braun V, Handtke K., (1992)** genetics of bacterial iron transport. In: *CRC handbook of microbial iron chelates*. Boca Raton, FL: CRC Press. Pp: 107-138.
- **Braun V, Schönherr R, Hobbie S. (1993)** Enterobacterial hemolysins: activation, secretion and pore formation. *Trends Microbiol.* Sep;1(6):211-6.

- **Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Ölschläger, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emödy, L., Gottschalk, G., Hacker, J. and Dobrindt, U., (2006)** How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains, *PNAS* August 22, Vol. 103, No. 34, 12879–12884.
- **Casalino, M., Prosseda, G., Barbagallo, M., Iacobino, A., Ceccarini, P., Latelle, M., Nicoletti M., Colonna, B., (2009)** Interference of the CadC regulator in the arginine-dependent acid resistance system of *Shigella* and enteroinvasive *E. coli*
- **Caprioli A, Falbo V, Roda LG, Ruggeri FM, Zona C. (1983)** Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun.*; 39(3):1300-6.
- **Carroll E.J., Schalm O.W., Lasmanis J., (1964)** Experimental coliform (*Aerobactin aerogenes*) mastitis: characteristics of the endotoxin and its role in pathogenesis, *Am. J. Vet. Res.* 25, 663-668.
- **Chen CS, Durst RA. (2006)** Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* with an array-based immunosorbent assay using universal protein G-liposomal nanovesicles. *Talanta.* 15;69(1):232-8. Epub 2005 Oct 27.
- **Cherny I, Rockah L, Levy-Nissenbaum O, Gophna U, Ron EZ, Gazit E. (2005)** The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *J Mol Biol.* 16; 352(2):245-52.
- **Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbaum, O., Gophna1, U., Ron1, E.Z., and Gazit1, E. (2005)** The Formation of *Escherichia coli* Curli Amyloid Fibrils is Mediated by Prion-like Peptide Repeats, (*J. Mol. Biol.*, 352, 245–252).
- **Chipperfield JR, Ratledge C. (2000)** Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals.*; 13(2):165-8.
- **Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF (2004)** RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 5(5):355-66.
- **Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S. & Svanborg, C. (1996)** Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9827–9832.
- **Currie, C. G., McCallum, K. & Poxton, I. R. (2001)** Mucosal and systemic antibody responses to the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157 in health and disease. *J Med Microbiol* 50, 345–354.
- **Currie, C. G. & Poxton, I. R. (1999)** The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157 : H7 and other non-O157 verotoxin-producing *E.coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24, 57–62.

- **Daines DA, Wright LF, Chaffin DO, Rubens CE, Silver RP., (2000)** NeuD plays a role in the synthesis of sialic acid in *Escherichia coli* K1. *FEMS Microbiol Lett.* Aug 15;189(2):281-4.
- **Delicato ER, de Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC. (2003)** Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol.* 1;94(2):97-103.
- **Dhondt, G., Burvenich, C., Peeters, G., (1977)** Mammary blood flow during experimental *Escherichia coli* endotoxin induced mastitis in goats and cows, *J. Dairy Res.* 44, 433-440.
- **Dobrindt, U. (2005)** (Patho-)genomics of *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**, 357–371.
- **Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004)** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 414–424.
- **Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J. (2003)** Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol.*; 185(6):1831-40.
- **Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. & Hacker, J. (2002)** Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **70**, 6365–6372.
- **Dobrindt U, Hentschel U, Kaper JB, Hacker J. (2002)** Genome plasticity in pathogenic and nonpathogenic enterobacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.*; 264(1):157-75.
- **Dobrindt, U., Hacker, J. (2001)** Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 550e557.
- **Dobrindt U, Reidl J. (2000)** Pathogenicity islands and phage conversion: evolutionary aspects of bacterial pathogenesis. *Int J Med Microbiol.*; 290(6):519-27.
- **Donato, G. M., Lelivelt, M. J. & Kawula, T. H. (1997)** Promoterspecific repression of *fimB* expression by the *Escherichia coli* nucleoid-associated protein H-NS. *J Bacteriol* **179**, 6618–6625.
- **Dorman CJ, McKenna S, Beloin C. (2001)** Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, a facultative intracellular pathogen. *Int J Med Microbiol.*; 291(2):89-96.

- **Döbereiner A, Schmid A, Ludwig A, Goebel W, Benz R. (1996)** The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by *Escherichia coli* alpha-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes. *Eur J Biochem.* 1; 240(2):454-60.
- **Durant, L. et al. (2007)** Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **75**, 1916–1925.
- **Eberhart, R.J., (1977)** Coliform mastitis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170, 1160-1163.
- **Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. (2004)** Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol.* Nov 30;104(1-2):91-101.
- **Ewers C, Janssen T, Wieler LH. (2003)**, Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)], *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*; 116(9-10):381-95.
- **Fernandez, M.I., Silva, M., Schuch, R., Walker, W.A., Siber, A.M., Maurelli, A.T., McCormick, B.A. (2001)** Cadaverine prevents the escape of *Shigella flexneri* from the phagolysosome: a connection between bacterial dissemination and neutrophil transepithelial signaling. *The Journal of infectious diseases*; 184(6):743-53.
- **Finlay BB, Cossart P. (1997)** Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 2; 276(5313):718-25. Review. Erratum in: *Science* Oct 17;278(5337):373.
- **Fiorentini, C., Matarrese, P., Straface, E., Falzano, L., Fabbri, A., Donelli, G., Cossarizza, A., Boquet P. and Malorni W., (1998)** Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis, *Exp Cell Res* **242**, pp. 341–350.
- **Fiorentini C, Fabbri A, Flatau G, Donelli G, Matarrese P, Lemichez E, Falzano L, Boquet P. (1997)** *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1; 272(31):19532-7.
- **Groisman EA, Ochman H. (1996)** Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.* 29; 87(5):791-4. Review. No abstract available.
- **Hacker, J., Hentschel, U. & Dobrindt, U. (2003)** Prokaryotic chromosomes and disease. *Science* **301**, 790–793.
- **Hacker, J. & Carniel, E. (2001)** Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* **2**, 376–381.
- **Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000)** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 641–679.

- **Hacker J, Kaper JB. (1999)** The concept of pathogenicity islands. In: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements (J.B. Kaper, J. Hacker). ASM Press, Washington D.C. pp. 1-12
- **Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. (1997)** Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.*; 23(6):1089-97.
- **Hacker J, Kestler H, Hoschützky H, Jann K, Lottspeich F, Korhonen TK. (1993)** Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infect Immun.*; 61(2):544-50.
- **Hacker J., (1992)** Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can. Microbiol. Jul*;38(7):720-7
- **Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R, Goebel W. (1990)** Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog.*; 8(3):213-25.
- **Hacker, J., Knapp, S. & Goebel, W. (1983)** *J. Bacteriol.* **154**, 1145–1152.
- **Hamann, J. 2002**, "Qualitativ hochwertige "normale" Milch"; *Großtierpraxis* 3:09, 12-21
- **Hanson MS, Pelzel SE, Latimer J, Muller-Eberhard U, Hansen EJ. (1992)** Identification of a genetic locus of *Haemophilus influenzae* type b necessary for the binding and utilization of heme bound to human hemopexin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1; 89(5):1973-7.
- **Harris, S.L., Spears, P.A., Havell, E.A., Hamrick, T.S., Horton, J.R. and Orndorff, P.E. (2001)** Characterization of *Escherichia coli* type 1 pilus mutants with altered binding specificities. *Journal of Bacteriology*, **183**, 4099-4102.
- **Heinrichs DE, Yethon JA, Amor PA, Whitfield C.J (1998)** The assembly system for the outer core portion of R1- and R4-type lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. The R1 core-specific beta-glucosyltransferase provides a novel attachment site for O-polysaccharides. *Biol Chem.*6; 273(45):29497-505.
- **Hochhut B, Wilde C, Balling G, Middendorf B, Dobrindt U, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Carniel E, Hacker J. (2006)** Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol.*; 61(3):584-95.
- **Hofman P, Le Negrate G, Mograbi B, Hofman V, Brest P, Alliana-Schmid A, Flatau G, Boquet P, Rossi B., (2000)** *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human

polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis, *J Leukoc Biol.* 2; 68(4):522-8.

- **Horiguchi Y., (2001)** *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors and *Bordetella* dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases, *Toxicon* **39**, pp. 1619–1627.

- **Horiguchi, Y., Nakai, T. and K. Kume K., (1991)** Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-e1 cells, *Infect Immun* **59**, pp. 1112–1116.

- **Hutchinson CA., Peterson SN., Gil RT., White O., Fraser CM., Smith HO., Venter JC. (1999)** Global transposon mutagenesis and animal mycoplasma genome. *Science* 286-2169.

- **Jann K, Jann B. (1992)** Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance., *Can J Microbiol.* 38(7):705-10.

- **Hung,C.S., Bouckaert,J., Hung,D., Pinkner,J., Widberg,C., DeFusco,A., Auguste,C.G., Strouse,R., Langermann,S., Waksman,G. et al. (2002)** Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Molecular Microbiology*, **44**, 903-915.

- **Johnson JR., Kaster, N., Kuskowski, MA., Ling GV., (2003)** Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection.. *J. Clin Microbiol Rev.*; 41(1):337-45.

- **Johnson JR., Russo TA., (2002)**, extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : “The other bad *E. coli*.”, *J. Lab. Clin. Med.*; 139(3)155-62.

- **Johnson JR, Stell AL. (2000)** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise., *J Infect Dis.*; 181(1):261-72. Erratum in: *J Infect Dis.*; 181(6):2122.

- **Johnson JR, Brown JJ. (1996)** A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal(alpha 1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*., *J Infect Dis.*; 173(4):920-6.

- **Johnson JR., (1991)** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection., *J. Clin Microbiol Rev.*; 4(1):80-128.

- **Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004)** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123e140.

- **Kaper, J. B. & Hacker, J. (1999)** Pathogenicity Islands and Other Mobile Genetic Elements of Diarrheagenic *Escherichia coli*. Chapter 3 in *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*, pp. 33–58. Washington, DC: American Society for Microbiology.

- **Keller R, Ordoñez JG, de Oliveira RR, Trabulsi LR, Baldwin TJ, Knutton S. (2002)** Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* May;70(5):2681-9.
- **Khan NA, Shin S, Chung JW, Kim KJ, Elliott S, Wang Y, Kim KS. (2003)** Outer membrane protein A and cytotoxic necrotizing factor-1 use diverse signaling mechanisms for *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells., *Microb Pathog.*; 35(1):35-42.
- **Khan A, Nandi RK, Das SC, Ramamurthy T, Khanam J, Shimizu T, Yamasaki S, Bhattacharya SK, Chaicumpa W, Takeda Y, Balakrish Nair G. (2003)** Environmental isolates of *Citrobacter braakii* that agglutinate with *Escherichia coli* O157 antiserum but do not possess the genes responsible for the biosynthesis of O157 somatic antigen., *Epidemiol Infect.*; 130(2):179-86.
- **Khan AS, Kniep B., Ölschläger TA., van Die I., Korhonen T., Hacker J., (2000)** Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* . *Inf. Immun.* Jun; p:3541-3547.
- **König B, Ludwig A, Goebel W, König W. (1994)** Pore formation by the *Escherichia coli* alpha-hemolysin: role for mediator release from human inflammatory cells. *Infect Immun.* Oct;62(10):4611-7.
- **Koronakis V, Hughes C. (1996)** Synthesis, maturation and export of the *E. coli* hemolysin. *Med Microbiol Immunol.*; 185(2):65-71.
- **Lawrence JG., Ochmann H. (1998)** Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:94 13-9417
- **Le Bouguéne C, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremont A, Gounon P, Garcia MI. (2001)** Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J Clin Microbiol.* May;39(5):1738-45.
- **Lohuis, J.A., Verheijden J.H., Burvenich C., van Miert A.S., (1988)** Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated administration, *Vet. Q.* 10, 109-116.
- **Lohuis, J.A., Verheijden J.H., Burvenich C., van Miert A.S., (1988)** Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 2. Metabolic aspects, *Vet. Q.* 10, 177-125.

- **Ludwig A, Garcia F, Bauer S, Jarchau T, Benz R, Hoppe J, Goebel W. (1996)** Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*; 178(18):5422-30.
- **Maurelli, A.T., Fernandez, R.E., Bloch, C.A., Rode, C.K., Fasano, A. (1998)** ‘‘Black holes’’ and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3943e3948.
- **Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R 3rd, Brown PK, Arné P, Brée A, Desautels C, Fairbrother JM., (2003a)** Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity., *Infect Immun.* 71(1):536-40.
- **Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R 3rd, Lehoux B, Fairbrother JM., (2003b)** Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages., *Infect Immun.*; 71(1):494-503.
- **Menestrina G, Moser C, Pellet S, Welch R. (1994)** Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology.* Feb 28;87(1-3):249-67.
- **Middendorf, B. et al. (2004)** Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J. Bacteriol.* 186, 3086–3096.
- **Miller, J. H. (1992)** *A Short Course in Bacterial Genetics.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- **Miller, V.L., Taylor, R.K., Mekalanos, J.J. (1987)** Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* 48, 271e279.
- **Mühdorfer I., Hacker J. (1994)** Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb. Pathogen.* 16:171-181
- **Mühdorfer I., Ziebuhr W., Hacker J. (2001)** *Escherichia coli* in Urinary Tract Infection In: *Mol.Med.Microbiol.* eds M. Sussmann et al. Aca. Press. pp. 585-603
- **Müller-Loennies, S., Zähringer, U., Seydel U., Kusumoto S., Ulmer A. J., and Rietschel E..Th. (1998)** What we know and don't know about the chemical and physical structure of lipopolysaccharide in relation to biological activity. *Prog.Clin.Biol.Res.* 397:51-72
- **Nagy, G., Dobrindt, U., Schneider, G., Khan, A. S., Hacker, J. & Emödy, L. (2002)** Loss of regulatory protein RfaH attenuates virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70, 4406–4413.
- **Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998)** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142–201.

- **Neely, M.N., Olson, E.R. (1996)** Kinetics of expression of the *Escherichia coli* cad operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* 178, 5522e5528.
- **Neely, M.N., Olson, E.R. (1994)** Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli* cad operon. *J. Bacteriol.* 176, 3278e3285.
- **Neilands JB. (1992)** Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30). *Can J Microbiol.*; 38(7):728-33.
- **Nougayrede, J. P. et al. (2006)** *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851.
- **Ochman, H., Davalos, L.M. (2006)** The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science* 331, 1730e1733.
- **Ochman, H., Moran, N.A. (2001)** Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* 292, 1096e1098
- **Ochman, H. & Jones, I. B. (2000)** Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO J* 19, 6637–6643.
- **Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. (2002)** Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents.*; 19(6):517-21.
- **Olsén A, Wick MJ, Mörgelin M, Björck L. (1998)** Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun.* Mar;66(3):944-9.
- **Ørskov, F. & Ørskov, I. (1975).** *Escherichia coli* O : H serotypes isolated from human blood. Prevalence of the K1 antigen with technical details of O and H antigenic determination. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 83, 595–600
- **Oswald, , Nougayrède, J-P., Taieb, F. and Sugai, M., (2005)** Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression, *Curr Opin Microbiol.* Feb;8(1):83-91.
- **Paape MJ, Schultze WD, Desjardins C, Miller RH., (1974)** Plasma corticosteroid, circulating leukocyte and milk somatic cell responses to *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis, *Am J Vet Res.*; 35(3):355-62.
- **Pere A, Leinonen M, Väisänen-Rhen V, Rhen M, Korhonen TK. (1985)** Occurrence of type-1C fimbriae on *Escherichia coli* strains isolated from human extraintestinal infections. *J Gen Microbiol*; 131(7):1705-11.
- **Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A,**

Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamoukis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. 25;409(6819):529-33. Erratum in: *Nature* 8; 410(6825):240.

- Plançon L, Du Merle L, Le Friec S, Gounon P, Jouve M, Guignot J, Servin A, Le Bouguéne C. (2003) Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol.* Oct;5(10):681-93.

- Pourbakhsh SA, Dho-Moulin M, Brée A, Desautels C, Martineau-Doize B, Fairbrother JM. (1997a) Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*., *Microb Pathog.*; 22(6):331-41.

- Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doizé B, Fairbrother JM. (1997b) Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens., *Vet Microbiol.*, 58(2-4):195-213.

- Prasadarao NV, Wass CA, Kim KS. (1996a) Endothelial cell GlcNAc beta 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect Immun.*; 64(1):154-60.

- Prasadarao NV, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH, Kim KS. (1996b) Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.*; 64(1):146-53.

- Prosseda, G., Latella, M.C., Barbagallo, M., Nicoletti, M., Kassas, R., Casalino, M., Colonna M., (2007) The two-faced role of cad genes in the virulence of pathogenic *Escherichia coli*, *Research in Microbiology* 158, 487-493

- Raetz, C., Whitfield, C., (2002) lipopolysaccharide endotoxins, *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 71: 635-700

- Ratledge C, Dover LG. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:881-941.

- Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K. & Whittam, T. S. (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406, 64–67.

- Rice EW, Sowers EG, Johnson CH, Dunnigan ME, Strockbine NA, Edberg SC. (1992) Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*., *J Clin Microbiol.*, 30(5):1315-6.

- Rietschel E.T. und Westphal O., (1999) Endotoxin: Historical Perspectives, in *Endotoxin in Health and Disease* (Brade H, Opal SM, Vogel SN, and Morrison DC eds) pp 1–30, Marcel Dekker, Inc., Basel.

- **Robbins JB, McCracken GH Jr, Gotschlich EC, Orskov F, Orskov I, Hanson LA., (1974)** Escherichia coli K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis., *N Engl J Med.*30; 290(22):1216-20.
- **Rode CK, Melkerson-Watson LJ, Johnson AT, Bloch CA. (1999)** Type-specific contributions to chromosome size differences in Escherichia coli. *Infect Immun.*; 67(1):230-6.
- **Russo TA, Johnson JR. (2000)** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC., *J Infect Dis.*;181(5):1753-4. Epub 15. No abstract available.
- **Russo TA, Wenderoth S, Carlino UB, Merrick JM, Lesse AJ., (1998)** Identification, genomic organization, and analysis of the group III capsular polysaccharide genes kpsD, kpsM, kpsT, and kpsE from an extraintestinal isolate of Escherichia coli (CP9, O4/K54/H5)., *J Bacteriol.*; 180(2):338-49.
- **Schmidt, H. & Hensel, (2004)** M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 14–56.
- **Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. (1997)** Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature.*12; 387(6634):725-9.
- **Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. (2004)** Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new E. coli O groups that include Verocytotoxin-producing E.coli (VTEC):O176, O177, O178, O179, O180 and O181.APMIS; 112(9):569-84.
- **Shimada T, Kosako Y, Isshiki Y, Hisatsune K. (1992)** Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 possesses somatic (O) antigen identical with that of Salmonella O301.*Curr Microbiol.*; 25(4):215-7.
- **Sobiraj, A.; Kron, A.; Schollmeyer, U.; Failing, K. (1997)** "Bundesweite Untersuchungen zur Erregerverteilung und In-vitro-Resistenz euterpathogener Bakterien in der Milch von Kühen mit subklinischer Mastitis"; *Tierärztl. Praxis*, 258:108-115
- **Sokurenko, E.V., Schembri, M.A., Trintchina, E., Kjaergaard, K., Hasty, D.L. and Klemm, P. (2001)** Valency conversion in the type 1 fimbrial adhesin of Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 41, 675-686.
- **Sokurenko, E.V., Hasty, D.L., Dykhuizen, D.E. (1999)** Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* 7, 191e195.
- **Sokurenko EV, Chesnokova V, Dykhuizen DE, Ofek I, Wu XR, Krogfelt KA, Struve C, Schembri MA, Hasty DL. (1998)** Pathogenic adaptation of Escherichia coli by natural variation of the FimH adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21;95(15):8922-6.

- **Suriyasatharpon, Heuer, Noordhuizen-Stassen and Schukken, (2000)**
Hyperketonemia
- **Tieng V, Le Bouguéne C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, Charron D, Toubert A. (2002)** Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99(5):2977-82. Epub Feb 5.
- **Vaara M, Vaara M, Nurminen M., (1999)** Outer membrane permeability barrier in *Escherichia coli* mutants that are defective in the late acyltransferases of lipid A biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother.*; 43(6):1459-62.
- **van den Bosch JF, Hendriks JH, Gladigau I, Willems HM, Storm PK, de Graaf FK. (1993)** Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. *Infect Immun.*; 61(3):800-6.
- **Virkola R, Westerlund B, Holthöfer H, Parkkinen J, Kekomäki M, Korhonen TK. (1988)** Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. *Infect Immun.*; 56(10):2615-22.
- **Watson, N., Duniak, D.S., Rosey, E.L., Slonczewski, J.L., Olson, E.R. (1992)** Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli* cad operon by external pH. *J. Bacteriol.* 174, 530e540.
- **Welch, DR. (2004)** Microarrays bring new insights into understanding of breast cancer metastasis to bone. *Breast Cancer Res.*; 6(2):61-4. Epub Oct 30.
- **Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd & 16 other authors (2002)** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17020–17024.
- **Welch, R. A. (2001)** RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 257, 85–111.
- **Welch, R. A. (1991)** *Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria*. *Mol Microbiol*, 5:521–29.
- **Weissman, S.J., Moseley, S.L., Dykhuizen, D.E. and Sokurenko, E.V. (2003)** Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bacteria. *Trends Microbiol.*, 11, 115-117.
- **Wessels MR et al. (1987)** A model of high-affinity antibody binding to type III group B *Streptococcus capsular polysaccharide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(24):9170-4.
- **Wilde, C. et al. (2008)** Delineation of the recombination sites necessary for integration of pathogenicity islands II and III into the *Escherichia coli* 536 chromosome. *Mol. Microbiol.* 68, 139–151

- **Willinger CC, Schramek H, Pfaller K, Pfaller W. (1992)** Tissue distribution of neutrophils in postischemic acute renal failure. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*; 62(4):237-43.

- **Wieler, L. H. (1997)** Bestimmung von Virulenzfaktoren boviner Shiga-toxinbildender *Escherichia coli* (STEC-) Stämme als Bewertungsgrundlage ihrer klinischen Bedeutung für Rind und Mensch. Habilitation, Universität Giessen.

- **Wieler, L. H. et al. (1996)** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. *J Clin Microbiol*, 34(12):2980–84.

- **Xia, Y. et al. (2000)** Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the papB protein. *EMBO J*, 19(7):1450–57.

- **Ziv, G., Schultze, WD. (1983)** Influence of intramammary infusion of polymyxin B on the clinicopathologic course of endotoxin-induced mastitis, *Am J Vet Res*. Aug;44(8):1446-50.

- **Zou CH, Knirel YA, Helbig JH, Zähringer U, Mintz CS., (1999)** Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O acetylation of the O polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide, *J Bacteriol.*, 181(13):4137-41.

7. Anhang(Tab.: 20 PCR-Ergebnisse der 222 *E. coli* -Stämme)

Virulenzgene		fimH	papAH	papEF	pap C	pap G allele I	pap G allele II	papG allele III	papGI	pap GII, III
bp		508	720	336	200	461	190	258	1.190	1.070
Stamm Nr.	Phylogenetische Linie									
2105	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2106	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2107	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2108	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2109	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2110	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2111	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2112	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2114	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2115	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2116	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2117	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2118	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2119	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2120	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2121	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2122	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2123	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2124	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2125	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2173	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2174	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2175	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2176	B2	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2178	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2179	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2180	B1	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2181	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2182	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2185	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2186	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2188	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2190	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2191	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2194	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2195	B2	+	+	+	+	+	-	+	+	-

Stamm Nr.		fimH	papAH	papEF	pap C	pap G allele I	pap G allele II	papG allele III	papGI	pap GII, III
2197	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2198	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2199	A	+	+	-	+	-	-	-	-	-
2200	B2	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2201	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2202	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2203	A?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1260	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1262	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1263	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1264	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1265	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI1069	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1356, 1357	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1550	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1551	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1552	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1553	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1554	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1555	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1556	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1557	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1560	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1561	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1562	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1563	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1564	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1854a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1854b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1855a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1855b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1856	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1857	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1858	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1859	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1860	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1861	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1862	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1863	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1864	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1865	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1867	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fimH	papAH	papEF	pap C	pap G allele I	pap G allele II	papG allele III	papGI	pap GII, III
1868	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1869	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1870	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
907	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
908	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
909	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
910	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
911	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
912	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
913	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
914	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
915	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
916	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
917	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
918	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
919	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
920	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
921	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
922	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
923	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
924	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
925	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
926	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
927	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
928	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
929	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
930	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
931	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
932	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
933	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
934	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
935	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
936	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1755	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1756	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1757	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1758a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1758b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1759	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1760	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1761	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1762	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1763a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fimH	papAH	papEF	pap C	pap G allele I	pap G allele II	papG allele III	papGI	pap GII, III
1763b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1764	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1765	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1766	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1767	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1768	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1769	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1770	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1771	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1772	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1773	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1774	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1775	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1776	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1777	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1778	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1779	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1780	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1781	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1782	A	+	+	+	+	-	-	-	-	+
1783	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1784	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1785	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1786	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1787	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1788	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1789	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1790	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1792	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1793	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1794	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1795	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1796	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1797	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1798	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1799	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1800	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1801	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1802	A	+	+	+	+	-	-	+	-	+
1803	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fimH	papAH	papEF	pap C	pap G allele I	pap G allele II	papG allele III	papGI	pap GII, III
1804	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1805	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1806	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1807	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1808	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1809	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1812	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1813	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1814	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1815	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1816	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1817	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1818a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1818b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1819	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1820a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1820b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1821	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1822	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1823	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1824	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1825a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1825b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1827a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1827b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1829	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1830	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1831a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1831b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1832	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1833a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1833b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1834a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1834b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1835	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1836	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1837	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1838	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1839	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1840	B2	+	+	+	+	-	-	+	-	+
1841	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1842	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1843a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fimH	papAH	papEF	pap C	pap G allele I	pap G allele II	papG allele III	papGI	pap GII, III
1843b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1844	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1845a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1845b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1846a	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1846b	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1847a	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1847b	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1848	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1849	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1850	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1851	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1852	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Viru- z- gene		sfa/foc DE	focG	sfaS	cvaC	kpsMT III	kpsMT II	kpsMT K5	kpsMT K1	ibeA
bp		410	360	240	680	392	272	159	153	170
Stamm Nr.	Phylo- genet- ische Linie						ExPEC virulence genes			
2105	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2106	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2107	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2108	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2109	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2110	B2	-	-	-	-	-	+	-	+	+
2111	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2112	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2114	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2115	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2116	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2117	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2118	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2119	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2120	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2121	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2122	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2123	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2124	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2125	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2173	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2174	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2175	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		sfa/foc DE	focG	sfaS	cvaC	kpsMT III	kpsMT II	kpsMT K5	kpsMT K1	ibeA
2176	B2	-	-	+	-	-	+	-	+	-
2178	D	-	-	-	+	-	+	+	-	-
2179	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2180	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2181	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2182	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2185	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2186	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2188	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2190	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2191	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2194	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2195	B2	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2197	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2176	B2	-	-	+	-	-	+	-	+	-
2178	D	-	-	-	+	-	+	+	-	-
2179	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2180	B1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2181	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2182	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2185	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2186	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2188	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2190	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2191	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2194	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2195	B2	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2197	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2198	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2199	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2200	B2	-	-	+	-	-	+	+	-	-
2201	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2202	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2203	A?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1260	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1262	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		sfa/foc DE	focG	sfaS	cvaC	kpsMT III	kpsMT II	kpsMT K5	kpsMT K1	ibeA
1263	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1264	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1265	D	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IMI1069	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1356, 1357	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1550	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1551	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1552	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1553	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1554	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1555	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1556	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1557	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1560	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1561	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1562	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1563	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1564	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1854a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1854b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1855a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1855b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1856	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1857	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1858	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1859	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1860	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1861	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1862	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1863	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1864	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1865	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1867	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1868	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1869	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1870	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
907	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
908	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
909	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
910	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
911	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		sfa/foc DE	focG	sfaS	cvaC	kpsMT III	kpsMT II	kpsMT K5	kpsMT K1	ibeA
912	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
913	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
914	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
915	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
916	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
917	D	-	-	-	-	+	-	-	-	-
918	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
919	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
920	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
921	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
922	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
923	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
924	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
925	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
926	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
927	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
928	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
929	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
930	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
931	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
932	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
933	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
934	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
935	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
936	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1755	D	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1756	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1757	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1758a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1758b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1759	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1760	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1761	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1762	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1763a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1763b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1764	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1765	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1766	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1767	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1768	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1769	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		sfa/foc DE	focG	sfaS	cvaC	kpsMT III	kpsMT II	kpsMT K5	kpsMT K1	ibeA
1770	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1771	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1772	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1773	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1774	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1775	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1776	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1777	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1778	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1779	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1780	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1781	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1782	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1783	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1784	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1785	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1786	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1787	A	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1788	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1789	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1790	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1792	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1793	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1794	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1795	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1796	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1797	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1798	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1799	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1800	B1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1801	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1802	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1803	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1804	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1805	A	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1806	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1807	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1808	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1809	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1812	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1813	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1814	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		sfa/foc DE	focG	sfaS	cvaC	kpsMT III	kpsMT II	kpsMT K5	kpsMT K1	ibeA
1815	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1816	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1817	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1818a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1818b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1819	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1820a	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1820b	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1821	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1822	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1823	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1824	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1825a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1825b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1827a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1827b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1829	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1830	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1831a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1831b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1832	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1833a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1833b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1834a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1834b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1835	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1836	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1837	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1838	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1839	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1840	B2	-	-	-	-	-	+	+	-	+
1841	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1842	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1843a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1843b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1844	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1845a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1845b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1846a	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1846b	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1847a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		sfa/foc DE	focG	sfaS	cvaC	kpsMT III	kpsMT II	kpsMT K5	kpsMT K1	ibeA
1847b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1848	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1849	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1850	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1851	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1852	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Virulenz-gene		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
bp		930	507	559	788	952	559	290	1.177	498
Stamm Nr.	Phylogenetische Linie									
2105	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2106	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2107	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2108	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2109	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2110	B2	+	-	-	-	-	-	+	+	-
2111	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2112	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2114	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2115	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2116	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2117	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2118	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2119	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2120	A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
2121	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2122	A	-	-	-	+	-	-	+	+	-
2123	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2124	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2125	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2173	A	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2174	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2175	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2176	B2	+	-	-	-	-	-	-	+	+
2178	D	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2179	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2180	B1	-	-	-	-	-	-	+	+	+
2181	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Stamm Nr.		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
2182	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2185	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2186	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2188	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2190	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2191	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2194	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2182	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2185	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2186	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2188	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2190	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2191	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2194	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2182	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2185	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2186	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2188	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2190	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2191	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2194	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2195	B2	+	-	-	+	-	-	-	+	+
2197	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2198	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2199	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2200	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	+
2201	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2202	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2203	A?	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1260	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1262	D	-	+	-	-	-	-	+	-	-
1263	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1264	B1	-	-	-	-	+	-	+	-	-

Stamm Nr.		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
1265	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI1069	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1356, 1357	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1550	B2	+	-	-	-	-	-	+	-	-
1551	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1552	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1553	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1554	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1555	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1556	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1557	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1560	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1561	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1562	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1563	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1564	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1854a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1854b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1855a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1855b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1856	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1857	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1858	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1859	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1860	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1861	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1862	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1863	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1864	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1865	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1867	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1868	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1265	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI1069	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1356, 1357	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1550	B2	+	-	-	-	-	-	+	-	-
1551	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1552	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1553	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1554	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1555	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
1556	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1557	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1560	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1561	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1562	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1563	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1564	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1854a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1854b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1855a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1855b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1856	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1857	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1858	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1859	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1860	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1861	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1862	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1863	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1864	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1865	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1867	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1868	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1869	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1870	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
907	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
908	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
909	B2	-	-	-	-	-	-	+	-	-
910	B1	-	-	-	-	-	-	+	+	-
911	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
912	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
913	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
914	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
915	B1	-	-	-	-	-	-	+	+	-
916	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
917	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
918	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
919	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
920	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
921	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
922	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
923	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
924	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
925	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
926	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
927	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
928	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
929	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
930	A	-	-	-	+	-	-	+	-	-
931	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
932	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
933	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
934	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
935	A	-	-	-	+	-	-	+	-	-
936	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1755	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1756	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1757	B1	-	-	-	-	+	-	+	-	-
1758a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1758b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1759	A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1760	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1761	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1762	A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1763a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1763b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1764	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1765	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1766	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1767	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1768	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1769	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1770	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1771	B2	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1772	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1773	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1774	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1775	B1	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1776	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1777	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1778	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1779	B1	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1780	A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1781	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1782	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1783	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
1784	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1785	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1786	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1787	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1788	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1789	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1790	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1792	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1793	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1794	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1795	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1796	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1797	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1798	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1799	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1800	A	-	+	-	-	-	-	-	+	-
1801	A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
1802	A	-	+	-	-	-	-	+	+	+
1803	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1804	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1805	B2	+	-	-	-	-	-	+	+	-
1806	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1807	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1808	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1809	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1812	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1813	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1814	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1815	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1816	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1817	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1818a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1818b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1819	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1820a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1820b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1821	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1822	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1823	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1824	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1825a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1825b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
1827a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1827b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1829	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1830	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1831a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1831b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1832	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1833a	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1833b	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1834a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1834b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1835	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1836	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1837	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1838	A	-	-	-	+	-	-	+	+	-
1839	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1840	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1841	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1842	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1843a	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1843b	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1844	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1845a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1845b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1846a	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1846b	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1847a	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1847b	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1848	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1849	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1850	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1851	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1827a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1827b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1829	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1830	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1831a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1831b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1832	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1833a	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1833b	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1834a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1834b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		PAI	bmaE	nfaE	rfc	gafD	afa/draBC	traT	hlyA	cnf1
1835	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1836	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1837	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1838	A	-	-	-	+	-	-	+	+	-
1839	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1840	B2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1841	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1842	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1843a	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1843b	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1844	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1845a	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1845b	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1846a	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1846b	D	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1847a	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1847b	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1848	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1849	B1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1850	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1851	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1852	B2	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Virulenzgene		fyuA	iutA	iroN	pks	iss	gimB	F17	K88
bp		880	300					537Bp	450BP
Stamm Nr.	Phylogenetische Linie								
2105	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2106	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2107	A	+	-	-	-	+	-	-	+
2108	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2109	A	-	+	-	-	-	-	-	-
2110	B2	+	+	-	+	-	+	-	+
2111	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2112	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2114	A	-	-	+	-	+	-	+	-
2115	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2116	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2117	A	+	-	-	-	-	-	-	+
2118	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2119	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2120	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2121	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2122	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2123	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2124	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2125	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2173	A	+	-	-	-	-	-	+	+
2174	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2175	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2176	B2	+	-	+	+	-	-	-	+
2178	D	-	+	+	-	+	-	-	-
2179	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2180	B1	-	+	+	-	-	-	-	-
2181	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2182	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2185	A	+	-	-	-	+	-	-	+
2186	A	+	-	-	-	-	-	-	+
2187	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2188	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2190	B1	-	-	-	-	+	-	-	-
2191	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2194	A	-	-	-	-	+	-	-	-
2195	B2	+	-	+	+	+	+	-	+
2197	B1	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fyuA	iutA	iroN	pks	iss	gimB	F17	K88
2198	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2199	A	+	+	-	-	-	-	-	+
2200	B2	+	-	+	+	+	-	-	+
2201	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2202	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2203	A?	-	-	-	-	-	-	-	-
1260	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1262	D	-	+	-	-	-	-	-	-
1263	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1264	B1	-	+	-	-	-	-	+	-
1265	D	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI1069	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1356, 1357	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1550	B2	+	-	+	-	+	-	-	+
1551	A	-	-	-	-	-	-	+	-
1552	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1553	A	-	-	-	-	+	-	-	-
1554	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1555	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1556	A	-	-	-	-	+	-	-	-
1557	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1560	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1561	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1562	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1563	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1564	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1854a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1854b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1855a	A	+	-	-	-	-	-	-	+
1855b	A	+	-	-	-	-	-	-	+
1856	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1857	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1858	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1859	A	-	-	-	-	-	-	+	-
1860	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1861	A	+	-	-	-	-	-	-	+
1862	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1863	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1864	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1865	A	-	-	+	-	+	-	-	-
1867	A	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fyuA	iutA	iroN	pks	iss	gimB	F17	K88
1868	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1869	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1870	A	-	-	-	-	-	-	-	-
907	A	-	-	-	-	+	-	-	-
908	A	-	-	-	-	-	-	-	-
909	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
1868	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1869	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1870	A	-	-	-	-	-	-	-	-
907	A	-	-	-	-	+	-	-	-
908	A	-	-	-	-	-	-	-	-
909	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
910	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
911	A	-	-	-	-	-	-	+	-
912	A	+	-	-	-	-	-	-	+
913	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
914	A	-	-	-	-	-	-	-	-
915	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
916	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
917	D	-	-	-	-	-	-	-	-
918	B1	+	-	+	-	+	-	-	+
919	A	-	-	-	-	-	-	+	-
920	A	-	-	-	-	-	-	+	-
921	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
922	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
923	A	-	-	-	-	-	-	-	-
924	A	-	-	+	-	+	-	-	-
925	A	-	-	-	-	+	-	+	-
926	A	-	-	-	-	-	-	-	-
927	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
928	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
929	A	-	-	-	-	-	-	-	-
930	A	-	-	-	-	-	-	-	-
931	A	-	-	-	-	-	-	-	-
932	A	-	-	-	-	-	-	-	-
933	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
934	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
935	A	-	-	-	-	-	-	-	-
936	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1755	D	-	-	-	-	+	-	+	-
1756	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1757	B1	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fyuA	iutA	iroN	pks	iss	gimB	F17	K88
1758a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1758b	A	-	-	-	-	+	-	-	-
1759	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1760	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1761	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1762	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1763a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1763b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1764	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1765	A	-	+	-	-	-	-	-	-
1766	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1767	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1768	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1769	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1770	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1771	B2	-	-	-	+	-	-	-	-
1772	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1758a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1758b	A	-	-	-	-	+	-	-	-
1759	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1760	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1761	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1762	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1763a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1763b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1764	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1765	A	-	+	-	-	-	-	-	-
1766	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1767	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1768	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1769	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1770	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1771	B2	-	-	-	+	-	-	-	-
1772	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1773	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1774	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1775	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1776	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1777	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1778	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1779	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1780	A	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fyuA	iutA	iroN	pks	iss	gimB	F17	K88
1801	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1802	A	+	-	-	-	-	-	-	+
1803	B1	-	-	+	-	-	-	-	-
1804	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1805	B2	+	+	-	+	-	-	-	+
1806	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1807	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1808	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1809	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1812	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1813	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1814	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1815	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1816	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1817	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1818a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1818b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1819	A	+	-	-	-	-	-	-	+
1820a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1820b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1821	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1822	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1823	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1824	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1825a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1825b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1827a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1827b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1829	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1830	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1831a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1831b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1832	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1833a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1833b	A	-	-	-	-	-	-	+	-
1834a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1817	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1818a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1818b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1819	A	+	-	-	-	-	-	-	+
1820a	A	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		fyuA	iutA	iroN	pks	iss	gimB	F17	K88
1820b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1821	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1822	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1823	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1824	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1825a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1825b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1827a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1827b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1829	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1830	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1831a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1831b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1832	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1833a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1833b	A	-	-	-	-	-	-	+	-
1834a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1834b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1835	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1836	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1837	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1838	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1839	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1840	B2	+	+	-	-	+	-	-	+
1841	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1842	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1843a	A	+	+	-	-	-	-	-	+
1843b	A	+	+	-	-	-	-	-	+
1844	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1845a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1845b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1846a	D	-	+	-	-	-	-	-	-
1846b	D	-	+	-	-	-	-	-	-
1847a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1847b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1848	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1849	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1850	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1851	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1852	B2	-	-	-	-	-	-	-	-

Virulenzgene		F17	K88	K99	F41	987P	F18	Afa 8	Afa 7
bp		537	450	200	515	390	320	300	ca.650
Stamm Nr.	Phylogenetische Linie			Adhesins of animal pathogenic <i>E. coli</i>					
2105	B1								
2106	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2107	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2108	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2109	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2110	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
2111	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2112	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2114	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2115	A	-	-	-	-	-	+	-	-
2116	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2117	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2118	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2119	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2120	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2121	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2122	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2123	B1	-	-	-	-	-	-	+	-
2124	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2125	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2173	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2174	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2175	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2176	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
2178	D	-	-	-	-	-	-	-	-
2179	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2180	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2181	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2182	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2185	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2186	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2187	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2188	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2189	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2190	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2191	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2192	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2194	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2195	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
2197	B1	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		F17	K88	K99	F41	987P	F18	Afa 8	Afa 7
2198	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2199	A	-	-	-	-	-	-	-	-
2200	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
2201	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2202	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
2203	A?	-	-	-	-	-	-	-	-
1260	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1262	D	-	-	-	-	-	+	-	-
1263	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1264	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1265	D	-	-	-	-	-	-	-	-
IMI1069	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1356, 1357	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1550	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
1551	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1552	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1553	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1554	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1555	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1556	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1557	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1560	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1561	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1562	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1563	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1564	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1854a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1854b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1855a	A	-	-	-	-	-	+	-	-
1855b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1856	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1857	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1858	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1859	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1860	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1861	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1862	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1863	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1864	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1865	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1867	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1868	A	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		F17	K88	K99	F41	987P	F18	Afa 8	Afa 7
909	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
910	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
911	A	-	-	-	-	-	-	-	-
912	A	-	-	-	-	-	-	-	-
913	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
914	A	-	-	-	-	-	-	-	-
915	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
916	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
917	D	-	-	-	-	-	-	-	-
918	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
919	A	-	-	-	-	-	-	-	-
920	A	-	-	-	-	-	-	-	-
921	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
922	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
923	A	-	-	-	-	-	-	-	-
924	A	-	-	-	-	-	-	-	-
925	A	-	-	-	-	-	-	-	-
926	A	-	-	-	-	-	-	-	-
927	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
928	B1	-	-	-	-	-	-	+	-
929	A	-	-	-	-	-	-	-	-
930	A	-	-	-	-	-	-	-	-
931	A	-	-	-	-	-	-	-	-
932	A	-	-	-	-	-	-	-	-
933	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
934	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
935	A	-	-	-	-	-	-	-	-
936	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1755	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1756	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1757	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1758a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1758b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1759	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1760	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1761	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1762	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1763a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1763b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1764	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1765	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1766	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1767	A	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		F17	K88	K99	F41	987P	F18	Afa 8	Afa 7
1768	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1769	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1770	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1771	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
1772	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1773	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1774	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1775	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1776	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1777	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1778	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1779	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1780	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1781	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1782	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1783	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1784	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1785	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1786	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1787	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1788	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1789	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1790	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1792	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1793	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1794	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1795	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1796	A	-	-	-	-	-	+	-	-
1797	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1798	B1	-	-	-	-	-	+	-	-
1799	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1800	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1801	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1802	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1803	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1804	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1805	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1806	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
1807	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1808	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1809	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1812	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1813	A	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		F17	K88	K99	F41	987P	F18	Afa 8	Afa 7
1814	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1815	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1816	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1817	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1818a	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1818b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1819	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1820a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1820b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1821	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1822	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1823	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1824	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1825a	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1825b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1826	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1827a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1827b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1829	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1830	A	-	-	-	-	-	-	+	-
1831a	A	-	-	-	-	-	-	+	-
1831b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1832	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1833a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1833b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1834a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1834b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1835	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1836	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1837	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1838	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1839	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1840	B2	-	-	-	-	-	-	-	-
1841	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1842	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1843a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1843b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1844	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1845a	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1845b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1846a	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1846b	D	-	-	-	-	-	-	-	-
1847a	A	-	-	-	-	-	-	-	-

Stamm Nr.		F17	K88	K99	F41	987P	F18	Afa 8	Afa 7
1847b	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1848	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1849	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
1850	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1851	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1852	B2	-	-	-	-	-	-	-	-

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc. No.....	accession number
asmp.	asymptomatisch
bp.....	Basenpaare
ca.	circa
d.h.	das heißt
DAEC.....	diffus adhärenzte <i>E. coli</i>
dATP.....	Desoxyadenosin-5`-Triphosphat
dCTP.	Desoxycytosin-5`-Triphosphat
DEC.....	diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>
dest.	destilliert
dGTP.....	Desoxyguanosin-5`-Triphosphat
DNA.....	Desoxyribonucleic (-acid)
dNTP.....	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT.....	Dithiothreitol
dTTP.....	Desoxythymidin-5`-Triphosphat
DR.....	”direct repeats”
EAEC.....	Enteraggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
A/E.....	attachment and
effacementECOR.....	<i>E. coli</i> collection of reference strains
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
EHEC.....	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC.....	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC.....	Enteropathogene <i>E. coli</i>
E-Hly.....	EHEC-Hämolysin
EPEC.....	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
et al.	und andere
ETEC.....	Enterotoxine <i>E. coli</i>
etc.	et cetera

EspP.....	extracellular serine protease, plasmid-encoded
Etp.....	EHEC type II secretion pathway
ExPEC.....	extraintestinal-pathogene <i>E. coli</i>
fwd.....	forward
g.....	Gramm
Gal.....	Galaktose
ggf.	gegebenenfalls
Glu.....	Glukose
h.....	Stunde
HC.....	Hämorrhagische Colitis
HPLC.....	high pressure liquid chromatographie
HUS.....	hämolytisch-urämisches Syndrom
IfSG.....	Infektionsschutzgesetz
IMS.....	Immunmagnetische Separation
IPEC.....	intestinale <i>E. coli</i>
IS.....	Insertionssequenz
Kap.....	Kapitel
KatP.....	Katalase/Peroxidase
Kb (p).....	Kilobasen (paare)
l.....	Liter
LB.....	Lysogeny Broth
LDH.....	Laktatdehydrogenase
LEE.....	locus of enterocyte effacement
LM.....	Lebensmittel
LPS.....	Lipopolysaccharid
MENEC.....	Meningitis-verursachende <i>E. coli</i>
mg.....	Milligramm
min.....	Minute
mind.	mindestens
ml.....	Milliliter
mm.....	Millimeter
mM.....	Millimolar

m. M.....	mit Mannose
MRHA.....	Mannose-resistente Hämagglutination
n.b.....	nicht bekannt
ND.....	not determined
NM.....	non-motile
NSF.....	nicht Sorbitol fermentierend
OD.....	optische Dichte
o.g.....	obern genannte
o.M.....	ohne Mannose
ORF.....	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PCR.....	polymerase chain reaction
PFGE.....	Pulsfeldgelelektrophorese
pO157.....	Plasmid von EHEC O157:H7
pSFO157.....	Plasmid von SF EHEC O157:HREBASE
rev.....	reverse
RFLP.....	Restriktions-Fragment-Längen- Polymorphismus
RT.....	Raumtemperatur
SDS.....	Sodium dodecyl sulfate
SE.....	Sodium EDTA
Sec.	Sekunde
SEPEC.....	Sepsis verursachende E. coli
SF.....	Sorbitol fermentierend
Sfp.....	sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded
SMAC.....	Sorbitol-MacConkey-Agar
s.o.....	siehe oben
sog.....	so genannte
Spez.	spezifischer
SSPE.....	Sodium chloride, Sodium Phosphate, EDTA
StcE	secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC

STEC.....	Shiga-Toxin produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx.....	Shiga-Toxin
s.u.....	siehe unten
Tab.....	Tabelle
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase.....	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE.....	Tris-Borat-EDTA
TE.....	Tris-EDTA
TNE.....	Tris-NaCl-EDTA
TNEX.....	Tris-NaCl-EDTA-Triton X-200
ToxB.....	Toxin B
Tris.....	Tris-(hydroxyethyl)-aminoethan
tRNA.....	transfer ribonucleic acid
u.a.....	und anderes
u.ä.....	und ähnliches
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
ÜN.....	Über Nacht
UPEC.....	Uropathogene <i>E. coli</i>
UTI.....	Urogenitaltraktinfektion
UV.....	Ultraviolett
V.....	Volt
v.a.....	vor allem
vgl.....	vergleiche
z.B.....	zum Beispiel
µg.....	Mikrogramm
µl.....	Mikroliter

Danksagung

Für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit im Institut für Infektionsbiologie in Würzburg, möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Hacker bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Dobrindt für die außerordentlich gute Betreuung meiner Dissertation.

Hiermit möchte ich mich für die Unterstützung und Geduld bei der Durchführung meiner Versuche in den Laboratorien am Röntgenring bedanken, insbesondere bei Barbara Plaschke für ihre stets freundliche Hilfestellung bei den praktischen Arbeiten.

Meinen lieben Eltern und besonders meinem Papa danke ich für die Unterstützung im langen Prozess des Schreibens, der viel Motivationshilfe und eine immer wieder anstehendes Korrekturlesen bedurfte.

Auch meiner Schwester, Claudia Reichardt, möchte ich noch einmal ganz herzlich für ihre Hilfe danken.