

INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND BIOLOGIE
C/O FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR BIOMEDIZINISCHE TECHNIK IBMT

ARBEITSGRUPPE ANGEWANDTE BIOELEKTRONIK UND BIOCHIPTECHNOLOGIE

Vergleichende geno- und phänotypische Charakterisierung von *Escherichia coli* aus Menschen, Hausschweinen und Wildtieren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin
Molekulare Bioanalytik

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Dipl.-Biol.
Ulrike Frömmel
geboren am 11.05.1975 in Dresden

Potsdam, April 2013

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0
Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6914/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-69147>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-69147>

Inhalt

Inhalt	1
1. Zusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	6
2.1 Intestinale Mikrobiota.....	6
2.2 <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.1 Das Bakterium <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> und virulenzassoziierte Gene.....	8
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> und Adhäsion	9
2.3 Pathogene <i>Escherichia coli</i>	11
2.3.1 Intestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>	11
2.3.2 Extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>	14
2.4 Hämolytische <i>Escherichia coli</i>	17
2.5 Methoden zur Typisierung von Bakterien.....	19
2.6 Zielstellung	20
3. Material.....	21
3.1 Bakterienstämme	21
3.2 Oligonukleotide	22
3.3 Zelllinien	25
3.4 Lösungen und Medien.....	25
3.5 Enzyme, Farbstoffe, Größenmarker, Chemikalien	26
3.6 Verbrauchsmaterial und Kits.....	27
3.7 Geräte.....	27
4. Methoden.....	29
4.1 Mikrobiologische Methoden.....	29
4.1.1 Anzucht und Isolierung von <i>Escherichia coli</i>	29
4.1.2 Konservierung und Kultivierung der <i>Escherichia coli</i> -Isolate	29
4.2 Molekularbiologische Methoden	30
4.2.1 Isolierung von DNA.....	30
4.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	30
4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion und Agarosegelelektrophorese.....	30
4.3 Arbeiten mit Mikropartikeln	31
4.3.1 Kopplung von Oligonukleotidsonden an Mikropartikel mit Methylimidazol.....	31
4.3.2 Immobilisierung von Mikropartikeln.....	31
4.3.3 Mikropartikelbasierte Multiplex-PCR.....	31
4.3.4 Auswertung des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays.....	32
4.4 Zellbiologische Methoden.....	33

4.4.1	Kultivierung von Zelllinien	33
4.4.2	Konservieren und Auftauen von Zellen	33
4.4.3	Zellanzahlbestimmung	34
4.4.4	Adhäsionsassay	34
4.4.5	EPEC-Adhäsionsassay	35
4.4.6	Zytotoxizitätsassay	35
4.5	Mikroskopische Methoden	35
4.5.1	Phasenkontrastmikroskopie	35
4.5.2	VideoScan-Fluoreszenzmikroskopie	36
4.5.3	AKLIDES®-Fluoreszenzmikroskopie	39
4.6	Statistische Methoden	40
5.	Ergebnisse	41
5.1	Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay	41
5.1.1	Prinzip des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays	41
5.1.2	Reproduzierbarkeit des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays	42
5.1.3	Semiquantitativer Nachweis der Amplifikate	42
5.1.4	Lagerung immobilisierter Mikropartikel	44
5.2	Virulenzassoziierte Gene des Darmbakteriums <i>Escherichia coli</i>	44
5.2.1	Virulenzassoziierte Gene und Phylogenie nicht hämolytischer <i>Escherichia coli</i>	44
5.2.2	Virulenzassoziierte Gene und Phylogenie hämolytischer <i>Escherichia coli</i>	47
5.2.3	Virulenzassoziierte Gene und <i>Escherichia coli</i> -Pathotypen	49
5.2.4	Vergleich hämolytischer und nicht hämolytischer <i>Escherichia coli</i> -Isolate	50
5.3	Adhäsionsassay	51
5.3.1	Prinzip des Adhäsionsassays	51
5.3.2	Fixierung und Fluoreszenzfärbung	51
5.4	Adhäsion von <i>Escherichia coli</i> auf eukaryotischen Zellen	54
5.4.1	Adhäsion nicht hämolytischer <i>Escherichia coli</i> an Epithelzellen	54
5.4.2	Assoziation zwischen VAGs, Phylogenie und Adhäsion von <i>Escherichia coli</i>	56
5.4.3	Adhäsionsmuster von <i>Escherichia coli</i>	57
5.4.4	Assoziation zwischen <i>Escherichia coli</i> -Pathotypen und Adhäsionsmustern	60
5.5	Zytotoxizitätsassay	61
5.5.1	Prinzip des Zytotoxizitätsassays	61
5.6	Zytotoxizität von <i>Escherichia coli</i>	61
5.6.1	Zytotoxizität hämolytischer <i>Escherichia coli</i> auf Epithelzellen	61
5.6.2	Assoziation zwischen VAGs, Phylogenie und Zytotoxizität von <i>Escherichia coli</i>	63
6.	Diskussion	65
6.1	Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay als Screeningmethode	65
6.2	Virulenzassoziierte Gene und Phylogenie von <i>Escherichia coli</i>	66

6.3	Reservoirre von <i>Escherichia coli</i>	69
6.3.1	Reservoirre extraintestinal pathogener <i>Escherichia coli</i>	69
6.3.2	Reservoirre intestinal pathogener <i>Escherichia coli</i>	70
6.4	Adhäsion von <i>Escherichia coli</i> auf Epithelzellen.....	72
6.5	Adhäsionsmuster.....	74
6.5.1	Adhäsionsmuster kommensaler <i>Escherichia coli</i>	74
6.5.2	Adhäsionsmuster pathogener <i>Escherichia coli</i>	76
6.6	Adhäsion in Abhängigkeit der Wirtsarten der <i>Escherichia coli</i> -Isolate	77
6.7	Zytotoxizität von <i>Escherichia coli</i>	78
6.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	81
7.	Literatur.....	83
8.	Anhang	98
8.1	Abkürzungen	98
8.2	Tabellen.....	98
8.3	Abbildungen	99
	Danksagung.....	100
	Eidesstattliche Erklärung.....	101

1. Zusammenfassung

Escherichia (E.) coli ist als kommensales Bakterium ein wichtiger Bestandteil des Mikrobioms von Menschen und Tieren, jedoch zudem der häufigste Infektionserreger des Menschen. Entsprechend des Infektionsortes werden intestinal pathogene (InPEC) und extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) unterschieden. Die Pathogenese von *E. coli*-Infektionen ist durch Virulenzfaktoren determiniert, welche von jeweils spezifischen virulenzassoziierten Genen (inVAGs und exVAGs) kodiert werden. Häufig werden exVAGs auch in *E. coli*-Isolaten aus dem Darm klinisch gesunder Wirte nachgewiesen. Dies führte zu der Vermutung, dass exVAGs die intestinale Kolonisierung des Wirtes durch *E. coli* unterstützen. Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, das Wissen über den Einfluss von exVAGs auf die Besiedlung und damit die Adhäsion von *E. coli* an Epithelzellen des Darmtraktes zu erweitern. Die Durchführung einer solch umfassenden *E. coli*-Populationsstudie erforderte die Etablierung neuer Screeningmethoden.

Für die genotypische Charakterisierung wurden neuartige mikropartikelbasierte Multiplex-PCR-Assays zum Nachweis von 44 VAGs und der Phylogenie etabliert. Für die phänotypische Charakterisierung wurden neuartige *in vitro* Adhäsions- und Zytotoxizitätsassays etabliert. Diese Screeningmethoden basieren auf der an der Hochschule Lausitz (FH) entwickelten VideoScan-Technologie, einem automatisierten hochselektiven bildbasierten Multifluoreszenzdetektionssystem. Es wurden 398 *E. coli*-Isolate aus 13 Wildsäugerarten und 5 Wildvogelarten sowie aus gesunden und harnwegserkrankten Menschen und Hausschweinen charakterisiert. Die Adhäsionsassays hatten zum Ziel, sowohl die Adhäsionsraten als auch die Adhäsionsmuster der 317 nicht hämolytischen Isolate auf humanen Darmepithel- (Caco-2), humanen Harnblasenepithel- (5637), humanen Kehlkopfepithel- (HEp-2), porcinen Darmepithel- (IPEC-J2) und porcinen Nierenepithelzellen (PK-15) zu bestimmen. Die toxische Wirkung der 81 hämolytischen Isolate wurde in Abhängigkeit der Inkubationszeit gegenüber den Epithelzelllinien LoVo (humanes Darmepithel), 5637, IPEC-J2 und PK-15 geprüft.

In den *E. coli*-Isolaten wurde eine Reihe von VAGs nachgewiesen. Potentielle InPEC, insbesondere shigatoxin-produzierende (STEC) und enteropathogene *E. coli* (EPEC) wurden aus Menschen, Hausschweinen und Wildtieren, vor allem aus Rehen (*Capreolus capreolus*) und Feldhasen (*Lepus europaeus*), isoliert. ExVAGs wurden mit stark variierender Prävalenz in *E. coli*-Isolaten aus allen untersuchten Arten detektiert. Die größte Anzahl und das breiteste Spektrum an exVAGs wurde in Isolaten aus dem Urin harnwegserkrankter Menschen, gefolgt von Isolaten aus Dachsen (*Meles meles*) und Rehen nachgewiesen. In Isolaten der phylogenetischen Gruppe B2 wurden mehr exVAGs detektiert als in den Isolaten der phylogenetischen Gruppen A, B1 und D.

Die Ergebnisse der Adhäsionsassays zeigten, dass die meisten *E. coli*-Isolate zelllinien-, gewebe- oder wirtsspezifisch adhärten. Ein Drittel der Isolate adhärte an keiner Zelllinie und nur zwei Isolate adhärten stark an allen Zelllinien. Grundsätzlich adhärten mehr Bakterien an humanen sowie an intestinalen Zelllinien. Besonders Isolate aus Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*) und Amseln (*Turdus merula*) sowie aus dem Urin harnwegserkrankter Menschen und Hausschweine waren in der Lage, stark zu adhären. Hierbei bildeten die *E. coli*-Isolate als Adhäsionsmuster diffuse Adhäsion, Mikrokolonien, Ketten und Agglomerationen.

Mittels statistischer Analysen wurden Assoziationen zwischen dem Auftreten einiger VAGs und einer hohen Adhäsionsrate ersichtlich. So war beispielsweise das Vorkommen des exVAGs *afa/dra*, welches das Afimbrial/Dr-Antigen-spezifische Adhesin kodiert, mit einer höheren Adhäsionsrate auf Caco-2- und 5637-Zellen und das Vorkommen des exVAGs *sfa/foc*, welches S-/F1C-Fimbrien kodiert, mit einer höheren Adhäsionsrate auf IPEC-J2-Zellen assoziiert.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays zeigten eine sehr starke und zeitabhängige Zerstörung der Monolayer aller Epithelzelllinien durch die α -Hämolyysin-positiven *E. coli*-Isolate. Auffallend war die hohe Toxizität hämolytischer Isolate aus Wildtieren gegenüber den humanen Zelllinien.

Mit den innerhalb dieser Arbeit entwickelten Screeningmethoden war es möglich, sowohl geno- als auch phänotypisch große Mengen an Bakterienisolaten zu charakterisieren. Es konnte ein Überblick über die Verbreitung von VAGs in *E. coli* aus unterschiedlichen Wirten und damit der Reservoir potentiell pathogener *E. coli* gewonnen werden. Besonders Wildtiere wurden sowohl durch den Nachweis von VAGs als auch deren Adhäsionsfähigkeit und ausgeprägter Zytotoxizität als Reservoir pathogener *E. coli* identifiziert. Ebenso wurde eine zelllinienspezifische Adhäsion von *E. coli*-Isolaten mit bestimmten exVAGs deutlich. Damit konnte der mögliche Einfluss von exVAGs auf die intestinale Kolonisierung bestätigt werden. In weiterführenden Arbeiten sind jedoch Expressions- und Funktionsanalysen der entsprechenden Proteine unerlässlich. Es wird anhand der Mikrokoloniebildung durch kommensale *E. coli* vermutet, dass Adhäsionsmuster und demzufolge Kolonisierungsstrategien, die bisher pathogenen *E. coli* zugeschrieben wurden, eher als generelle Kolonisierungsstrategien zu betrachten sind. Das *E. coli*- α -Hämolyysin wirkt im Allgemeinen zytotoxisch auf Epithelzellen. Ein in der Fachliteratur diskutierter adhäsionsunterstützender Mechanismus dieses Toxins ist demnach fragwürdig. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die entwickelten Screeningmethoden umfassende Analysen einer großen Anzahl an *E. coli*-Isolaten ermöglichen.

2. Einleitung

2.1 Intestinale Mikrobiota

Nach Schätzungen besteht die humane intestinale Mikrobiota aus etwa 1.800 Genera mit 15.000 bis 36.000 Arten (Frank *et al.* 2007). Die Mikrobiota setzt sich zu über 99% aus den Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Actinobacteria* zusammen, wobei ca. 99% der Bakterien des Intestinaltraktes strikt anaerob sind. Bakterien des Phylums *Proteobacteria*, wie die Genera *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* und *Proteus* sind fakultativ anaerob und in dem strikt anaeroben Milieu des Intestinaltraktes nur zu 0,1% vertreten (Eckburg *et al.* 2005). Nur wenige der bakteriellen Spezies des Intestinaltraktes konnten bisher kultiviert und charakterisiert werden (Lievín-Le Moal und Servin 2006; Frank *et al.* 2007).

Die Co-Evolution von Säugern und deren Mikrobiota bewirkt die Ausbildung komplexer synergistischer und kompetitiver Interaktionen sowohl zwischen den Bakterienarten als auch zwischen Mikrobiota und Wirt. So ist die Entwicklung des Immunsystems des Wirtes abhängig von der Ausbildung der intestinalen Mikrobiota (Bauer *et al.* 2006; Chowdhury *et al.* 2007; Round und Mazmanian 2009). Die Stimulation intestinaler Epithelzellen durch die intestinale Mikrobiota führt zu deren Differenzierung und beeinflusst deren Genexpression, wodurch die Angiogenese und die humorale und zelluläre Immunantwort, z.B. durch die Induktion der Sekretion des für die mukosale Immunität bedeutenden Antikörpers Immunglobulin A (IgA) angeregt werden (Cebra 1999; Hooper *et al.* 2001; Stappenbeck *et al.* 2002; Chowdhury *et al.* 2007; Round und Mazmanian 2009). Die Adaption des Wirtes an die Aktivität der Mikrobiota resultiert in der Ausprägung regulatorischer Mechanismen, welche zur Homöostase zwischen Wirt und Mikrobiota beitragen (Kelly und Conway 2005; Macpherson *et al.* 2005). Die Ausbildung der Mukosa ist diesbezüglich von herausragender Bedeutung (Chowdhury *et al.* 2007). Diese dient nicht nur als physikalische Schutzschicht vor Dehydratation oder zur Inhibierung der Adhäsion und Invasion der Bakterien, sondern enthält zudem durch Epithelzellen des Intestinaltraktes sezernierte antimikrobielle Substanzen wie Defensine und Cathelizidine (Bauer *et al.* 2006; Meyer-Hoffert *et al.* 2008; Round und Mazmanian 2009).

Durch den Metabolismus der Bakterien des Intestinaltraktes werden Nahrungsbestandteile in für den Wirt essenzielle Substanzen umgewandelt. Neben der Synthese kurzkettiger Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat wird das pflanzliche Vitamin K1 (Phytomenadion) in das vom Körper u.a. für die Blutgerinnung benötigte Vitamin K2 umgewandelt (Albert *et al.* 1980; Flint *et al.* 2008). Dieser Metabolismus wurde in *E. coli* analysiert (Jiang *et al.* 2010; Kong und Lee 2011). Die Bedeutung der intestinalen Mikrobiota wird besonders bei Wiederkäuern deutlich. Pflanzliche Substanzen wie Cellulose, Pektin, 1-3,1-4- β -Glukane und Arabinoxylane werden vollständig durch intes-

tinale Bakterien abgebaut und können daraufhin erst vom Tier verwertet werden (Bäckhed *et al.* 2005). Dementsprechend wird der Metabolismus des Wirtes durch den Einfluss der Kommensalen des Intestinaltraktes auf intestinale Epithelzellen reguliert (Bäckhed *et al.* 2004; Bäckhed *et al.* 2005; Macpherson *et al.* 2005). Zudem wurde bestimmten Bakterien der Mikrobiota ein probiotischer Einfluss auf die Gesundheit und Funktionsfähigkeit des Wirtsorganismus zugeschrieben (Round und Mazmanian 2009). Hervorzuheben ist diesbezüglich der *E. coli*-Stamm Nissle 1917, welcher bereits seit fast 100 Jahren medikamentös bei Durchfällen, Darmentzündungen, Verstopfung und zur Stärkung des Immunsystems eingesetzt wird (Boudeau *et al.* 2003; Ukena *et al.* 2007; Huebner *et al.* 2011; Jacobi und Malfertheiner 2011; Schierack *et al.* 2011).

Intestinale Bakteriengemeinschaften sind sehr komplex und individuell, sowohl in verschiedenen Wirten, als auch zeitlich und örtlich innerhalb eines Wirtes. Die Kolonisation, d.h. das Wachstum und die Verbreitung von Bakterien auf Haut und Schleimhäuten innerhalb eines Wirtes, ist abhängig von physiologischen Eigenschaften der Bakterien, aber auch von der Ernährung, dem Alter, dem Geschlecht, Erkrankungen und dem Lebensraum des Wirtes (Moore und Moore 1995; Hopkins *et al.* 2002; Eckburg *et al.* 2005). Innerhalb eines Wirtes existieren verschiedene Mikrohabitate und metabolische Nischen, in denen bestimmte abiotische und biotische Faktoren das Wachstum, das Überleben und die Reproduktion der Mikroorganismen beeinflussen (Savage 1977; Mackie *et al.* 1999; Hooper *et al.* 2002). Fakultativ anaerobe Bakterien wie *E. coli* siedeln z.B. eher in räumlicher Nähe zu Epithelzellen, um den dort vorhandenen Sauerstoff nutzen zu können (Kaper *et al.* 2004; Lievin-Le Moal und Servin 2006; Frank *et al.* 2007). Zusätzlich können sich intestinale Bakterien untereinander durch Konkurrenz um Ressourcen wie Nährstoffe (Exploitation) sowie der Produktion antimikrobieller Peptide, wie etwa Microzine (Interferenz), Vorteile für deren Kolonisation verschaffen (Saarela *et al.* 2000; Riley und Wertz 2002; Zschüttig *et al.* 2012). Die Bakterien konkurrieren zudem um Fläche und Oberflächenrezeptoren der Epithelzellen des Wirtes (kompetitive Exklusion)(Collado *et al.* 2007). Mechanismen wie Antagonismus (bakterielle Interferenz) und kompetitive Exklusion der intestinalen Mikrobiota sind wirkungsvoll gegen eine zu hohe Bakteriendichte und gegen die Dominanz pathogener Bakterienstämme innerhalb eines Wirtes, wodurch eine residente Besiedlung intestinaler metabolischer Nischen ermöglicht wird (Mack und Lebel 2004; Servin 2004).

2.2 *Escherichia coli*

2.2.1 Das Bakterium *Escherichia coli*

Das besterforschte Bakterium verdankt seinen Namen Theodor Escherich (Castellani und Chalmers 1919), welcher dieses erstmals 1885 in der deutschen Fachzeitschrift „Fortschritte der Medizin“ beschrieb (Escherich 1988; Escherich 1989). Die Art *Escherichia (E.) coli* gehört zum Phylum

Protobacteria, zur Klasse *Gammaproteobacteria*, zur Ordnung *Enterobacteriales*, zur Familie *Enterobacteriaceae* und zur Gattung *Escherichia*. Es sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose, peritrich begeißelte, stäbchenförmige Bakterien mit 2 bis 4 µm Durchmesser. Sie sind Oxidase negativ, Katalase positiv und können, bis auf seltene Ausnahmen, Laktose fermentieren. Diese Bakterienart ist geprägt durch eine sehr hohe Anzahl genetisch leicht voneinander abweichender Stämme. Es wurden bereits über 700 unterschiedliche Serotypen nachgewiesen (Eisenstein und Zaleznik 2000). Diese werden durch O-Antigene (Polysaccharid-Seitenketten der Lipopolysaccharide in der äußeren Membran), H-Antigene (flagellare Proteine), K-Antigene (Kapselpolysaccharide) und F-Antigene (Fimbrien) differenziert (Griffin und Tauxe 1991). Ausgehend von der spezifischen Kombination von O- und H-Antigentypen wird der Serotyp eines Isolates definiert (Kauffmann 1947). Mit den Laborderivaten des *E. coli* K12-Stammes wurden grundlegende Erkenntnisse der Phagengenetik, bakterieller Konjugation, Rekombination, Genregulation und Replikation der Chromosomen gewonnen (Touchon *et al.* 2009). Die 4.639.221 Basenpaare (bp) umfassende Sequenz des Kerngenoms von *E. coli* K12 wurde 1997 veröffentlicht (Blattner *et al.* 1997). Es enthält 4.288 proteinkodierende Gene, sieben Gene für rRNA und 83 Gene für tRNA (Knippers 2001).

Das natürliche Habitat von *E. coli* ist der untere Intestinaltrakt der Gnathostomata. *E. coli* wurde bereits häufig aus Menschen, Hausschweinen und weiteren domestizierten Tieren isoliert (Beutin *et al.* 1993; Schierack *et al.* 2007; Schierack *et al.* 2009; Boisen *et al.* 2012; Johnson *et al.* 2012). Auch aus Wildtieren wie Wiederkäuern oder Vögeln konnten *E. coli* isoliert werden (Renter *et al.* 2001; Gordon und Cowling 2003). *E. coli* wurde jedoch auch in Reptilien, Amphibien und Fischen nachgewiesen (Souza *et al.* 1999; Gordon und Cowling 2003). Es wurden Isolate sowohl aus erkrankten als auch aus klinisch gesunden Wirten entnommen. Es ist davon auszugehen, dass gesunde Wirte, welche potentiell pathogene *E. coli* enthalten, als Reservoir und Überträger pathogener Stämme einzustufen sind. Die Verbreitung dieser pathogenen Stämme kann über Wasser, jedoch auch über Faeces oder kontaminierte Lebensmittel erfolgen. Aufgrund dessen gilt *E. coli* als Indikator für fäkale Verunreinigungen in Lebensmitteln, Trink- und Badewasser (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: www.bvl.bund.de). Der Nachweis von *E. coli* im Boden, in Sedimenten und Gewässern zeigt dessen ubiquitäre Verbreitung außerhalb der Wirtsorganismen (Hartl und Dykhuizen 1984; Higgins *et al.* 2007; Ishii *et al.* 2007a; Walk *et al.* 2007).

2.2.2 *Escherichia coli* und virulenzassoziierte Gene

Die Kolonisation und Infektion eines Wirtes durch *E. coli* wird durch Virulenzfaktoren, welche von virulenzassoziierten Genen (VAGs) kodiert werden, vermittelt (Johnson 1991; Kaper *et al.* 2004). VAGs sind sehr häufig Teil des flexiblen bakteriellen Genpools, bestehend aus Plasmiden, Phagen und

Pathogenitätsinseln (Hacker und Kaper 2000), was die Übertragung genetischer Information zwischen einzelnen Bakterien fördert (Touchon *et al.* 2009). Daraus resultiert eine sehr effiziente Genomplastizität (Ahmed *et al.* 2008). Rearrangements des Genpools erfolgen meist als Reaktion auf veränderte Wachstumsbedingungen durch Kolonisation oder Infektion des Wirtes (Hacker und Kaper 2000; Dobrindt *et al.* 2002; Touchon *et al.* 2009) und beeinflussen die Diversität von *E. coli*-Populationen. Dies ermöglicht zudem die Entwicklung und Verbreitung pathogener Stämme (Ahmed *et al.* 2008).

In *E. coli* wurde bereits eine Reihe von VAGs identifiziert, die in die Kolonisation, Adhäsion, Invasion und den Schutz vor der Immunantwort des Wirtes involviert sind (Nataro und Kaper 1998). Eine Auswahl verschiedener VAGs mit deren Funktion und Beschreibung ist in Tab. 1 zusammengestellt. VAGs, die in die Pathogenese einer Infektion mit extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC) involviert sind, werden als exVAGs bezeichnet. VAGs, die typisch für die Pathogenese einer Infektion durch intestinal pathogene *E. coli* (InPEC) sind, werden als inVAGs bezeichnet. In Isolaten aus erkrankten Wirten, jedoch auch in Isolaten aus gesunden Wirten wurden inVAGs und exVAGs nachgewiesen (Beutin *et al.* 2003; Nowrouzian *et al.* 2006; Schierack *et al.* 2007; Schierack *et al.* 2008; Moreno *et al.* 2009; Boisen *et al.* 2012). Zudem wurde festgestellt, dass intestinale *E. coli* aus klinisch gesunden Wirten in der Lage sind, durch exVAGs extraintestinale Erkrankungen hervorzurufen (Ewers *et al.* 2009a). Es ist allerdings noch nicht verstanden, ob das Intestinum als Reservoir für ExPEC einzustufen ist und ob exVAGs in die intestinale Kolonisierung involviert sind. Erste Studien weisen tatsächlich auf einen positiven Einfluss von exVAGs, insbesondere von Siderophoren, auf die intestinale Kolonisierung durch *E. coli* hin (Nowrouzian *et al.* 2006; Schierack *et al.* 2008; Tenaillon *et al.* 2010).

2.2.3 *Escherichia coli* und Adhäsion

Die erfolgreiche Besiedlung ökologischer Nischen, z.B. des Intestins oder extraintestinaler Organe durch Bakterien ist abhängig von deren initialen Adhäsion an Wirtszellen und schließt die Konkurrenzfähigkeit gegenüber anderen Bakterien und dem Immunsystem des Wirtes ein (Pizarro-Cerdá und Cossart 2006; Jacobi und Malfertheiner 2011; Schierack *et al.* 2011). Die Adhäsion von *E. coli* und damit die Ausbildung von Adhäsionsmustern ist u.a. von bakteriellen Adhäsionsfaktoren, entsprechenden Rezeptoren der Wirtszellen, dem Wachstumsmilieu und der initialen Infektionsdosis abhängig (Kenny *et al.* 1997; Anderson *et al.* 2007; Yin *et al.* 2011). Adhäsion ist zudem eine wichtige Voraussetzung für pathogene Stämme, welche durch die Interaktion unterschiedlichster Virulenzfaktoren in der Lage sind, die Stoffwechselfunktionen des Wirtes zu ihren Gunsten zu manipulieren und

für ihr Wachstum und ihre Verbreitung auf oder in den Zellen des Wirtes auszunutzen (Pizarro-Cerdá und Cossart 2006).

Tab. 1: Virulenzassoziierte Gene (VAGs) von *E. coli* unterteilt in exVAGs (typisch für extraintestinal pathogene *E. coli*) und inVAGs (typisch für intestinal pathogene *E. coli*) mit deren Funktion.

	Gene	Funktion	Beschreibung
exVAGs	<i>afa/dra</i>	Adhesin	Central region of Afimbrial/Dr antigen-specific adhesin operons (AFA, Dr, F1845)
	<i>csgA</i>	Adhesin	Curlin sigma S-dependent growth
	<i>fimC</i>	Adhesin	Type 1 fimbriae (D-mannose-specific adhesin), chaperone
	<i>hra</i>	Adhesin	Heat-resistant agglutinin
	<i>mat</i>	Adhesin	Meningitis-associated and temperatureregulated fimbriae
	<i>papC</i>	Adhesin	pyelonephritis-associated fimbria, chaperone
	<i>sfa/foc</i>	Adhesin	Central region of S fimbriae (sialic acid-specific) and F1C fimbriae operons
	<i>tsh</i>	Adhesin	Temperature-sensitive haemagglutinin
	<i>ibeA</i>	Invasin	Invasion of brain endothelium
	<i>tia</i>	Invasin	Toxigenic invasion locus in ETEC strains
	<i>chuA</i>	Siderophor	Heme receptor gene (<i>E. coli</i> haem utilisation)
	<i>fyuA</i>	Siderophor	Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)
	<i>ireA</i>	Siderophor	Iron-responsive element (catecholate siderophore receptor)
	<i>iroN</i>	Siderophor	Catecholate siderophore (salmochelin) receptor
	<i>irp2</i>	Siderophor	Iron-repressible protein (yersiniabactin synthesis)
	<i>iucD</i>	Siderophor	Aerobactin synthesis
	<i>iutA</i>	Siderophor	Ferric aerobactin receptor (iron uptake/transport)
	<i>sitchr</i>	Siderophor	Salmonella iron transport system gene
	<i>sitep</i>	Siderophor	Salmonella iron transport system gene
	<i>malX</i>	Sonstiges	Pathogenicity-associated island marker CFT073
	<i>pic</i>	Sonstiges	Serin protease autotransporter
	<i>cvi/cva</i>	Protectin	Structural genes of colicin V operon (microcin ColV)
	<i>iss</i>	Protectin	Increased serum survival
	<i>ompA</i>	Protectin	Outer membrane protein A
	<i>traT</i>	Protectin	Transfer protein / Surface exclusion, serum survival
	<i>astA</i>	Toxin	heat-stable cytotoxin associated with enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)
	<i>cnf1/2</i>	Toxin	Cytotoxic necrotising factor 1 and 2
<i>hlyA</i>	Toxin	α -Haemolysin	
<i>sat</i>	Toxin	Secreted autotransporter toxin	
<i>vat</i>	Toxin	Vacuolating autotransporter toxin	
inVAGs	<i>daaD</i>	Adhesin	Afa/Dr adhesin F1845
	<i>eaeA</i>	Adhesin	Membran protein Intimin
	<i>faeG</i>	Adhesin	F4 fimbrial adhesin / K88
	<i>fanA</i>	Adhesin	biogenesis of K99 fimbriae
	<i>fasA</i>	Adhesin	F6 fimbrial adhesin / 987P
	<i>fedA</i>	Adhesin	F18 fimbrial adhesin
	<i>fimF41a</i>	Adhesin	F41 fimbrial adhesin
	<i>ipaH</i>	Invasin	Invasion plasmid antigen H
	<i>eltB</i>	Toxin	heat-labile toxin 1b subunit
	<i>est1</i>	Toxin	heat-stable toxin 1
	<i>est2</i>	Toxin	heat-stable toxin 2
	<i>stx1</i>	Toxin	Shiga toxin 1
	<i>stx2/stx2e</i>	Toxin	Shiga toxin 2 / Shiga toxin 2e
	<i>aggR</i>	Sonstiges	transcriptional regulator protein

Notwendig hierfür sind spezielle Proteine, sogenannte Adhäsine, welche am Ende filamentöser Oberflächenstrukturen (Fimbrien), oder direkt in der Bakterienmembran verankert sind (nicht fimbriale Adhäsine). Sie können spezifisch an bestimmte Wirtszellrezeptoren, z.B. Glykoproteine, Glykolipide oder andere Carbohydrate binden (Hultgren *et al.* 1991; Pizarro-Cerdá

und Cossart 2006). Die Expression unterschiedlicher Adhäsine mit deren Affinität zu bestimmten Wirtszellrezeptoren führt zur Gewebe- und Wirtsspezifität von Bakterien (Hultgren *et al.* 1991; Pizarro-Cerdá und Cossart 2006). Bekannte Virulenz- und Adhäsionsfaktoren werden im Abs. 2.3 beschrieben.

2.3 Pathogene *Escherichia coli*

E. coli ist der häufigste Erreger bakterieller Infektionen des Menschen (Kayser *et al.* 2010). Eine strikte Differenzierung pathogener und nicht pathogener *E. coli* ist jedoch aufgrund der schnellen Adaption des bakteriellen Phänotyps an veränderte Umweltbedingungen schwierig (Pallen und Wren 2007). Neben den überwiegend kommensalen Stämmen im Intestinaltrakt von Säugern und Vögeln treten pathogene Stämme auf, die Verursacher eines breiten Spektrums von harmlosen bis lebensbedrohenden Infektionen wie Diarrhö, Harnwegsinfekten, Septikämien oder Meningitiden sind (Nataro und Kaper 1998; Russo und Johnson 2003). Die Übertragung erfolgt in der Regel durch kontaminierte Lebensmittel, Trinkwasser oder Oberflächenwasser (Oralinfection), aber auch durch Autoinfektion oder die Übertragung von Mensch zu Mensch, Mensch zu Tier, Tier zu Mensch oder Tier zu Tier (Tröpfchen- und Schmierinfektion). In Abhängigkeit des Vorkommens spezifischer VAGs resultieren spezifische Infektionsmechanismen und Adhäsionsmuster, was zur Definition von *E. coli*-Pathotypen führte (Kaper *et al.* 2004). Eine stetig steigende Anzahl an Gruppierungen zeigt die hohe Diversifizierung dieses Krankheitserregers. Entsprechend des Infektionsortes werden intestinal pathogene *E. coli* (InPEC) und extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) unterschieden (Nataro und Kaper 1998; Russo und Johnson 2000). Im Folgenden werden die wichtigsten Pathotypen beschrieben.

2.3.1 Intestinal pathogene *Escherichia coli*

Enteropathogene *E. coli* (EPEC). EPEC verursachen Säuglingsenteritis, die besonders in Entwicklungsländern noch heute zur Säuglingssterblichkeit führt (Nataro und Kaper 1998; Clarke 2001). Symptome einer EPEC-Infektion sind wässrige Diarrhö, teilweise begleitet von Erbrechen und Fieber (Trabulsi *et al.* 2002; Thapar und Sanderson 2004). In der Tierzucht gehören EPEC zu den hauptsächlich wässrige Diarrhö verursachenden pathogenen *E. coli* (Zhu *et al.* 1994).

EPEC können über das Adhäsin Intimin charakterisiert werden. Die Sequenz des Intimin kodierenden inVAGs *eaeA* ist auf der sogenannten *locus of enterocyte effacement* (LEE)-Pathogenitätsinsel lokalisiert. Auf diesem Fragment sind alle für den Anheftungsvorgang relevanten Gene kodiert, z.B. Gene des Typ-III-Sekretionssystems. Intimin-induzierte Adhäsion führt über komplexe Reaktionsmechanismen zur Proliferation und Polymerisation filamentösen Aktins der Epithelzellen (Knutton *et al.* 1989; Sonnenberg und Kaper 1992; Nataro und Kaper 1998). Es kommt zur Ausbil-

dung sogenannter *attaching and effacing*-Läsionen (A/E-Läsionen)(Moon *et al.* 1983). Auf Basis der Modell-Zelllinie HEp-2 wurden Adhäsionsassays zur Diagnose von EPEC entwickelt, welche aufgrund der Bildung der A/E-Läsionen und Mikrokolonien detektiert wurden. Basierend auf verschiedenen Intimin-Subtypen wurden Gewebe- und Wirtstropismen der EPEC beschrieben (Phillips *et al.* 2000; Reece *et al.* 2001; Fitzhenry *et al.* 2002; Torres *et al.* 2005; Mundy *et al.* 2007). Zusätzlich sind EPEC in der Lage, *tight junctions* aufzulösen und die Barrierefunktion des Darmepithels und die Bürstensaummikrovilli zu zerstören. Dadurch kommt es zum Verlust der resorptiven Oberflächen im Darm und folgend zu Diarrhö (Nataro und Kaper 1998; Celli *et al.* 2000; Frankel und Phillips 2008).

EPEC werden in Abhängigkeit des *EPEC Adherence Factor Plasmids* (pEAF) (Tobe *et al.* 1999) in typische EPEC (pEAF⁺, tEPEC) und atypische EPEC (pEAF⁻, aEPEC) differenziert (Kaper *et al.* 2004). Auf dem EAF-Plasmid sind die Sequenzen der Gene für Virulenzfaktoren, beispielsweise der TypIV-Fimbrien wie *bundle-forming pili* (BFP), lokalisiert (Giron *et al.* 1991; Sonnenberg und Kaper 1992). BFP sind für die initiale Adhäsion der EPEC durch direkte Interaktion mit der Wirtszelle verantwortlich. Sie bewirken die Autoaggregation der Bakterien und damit die Ausbildung von Mikrokolonien (Tobe und Sasakawa 2001). Typische EPEC sind *in vitro* in der Lage, nach bereits drei Stunden kompakte Mikrokolonien (*localized adherence*: LA) auf Epithelzellen auszubilden (Sonnenberg und Kaper 1992). Das Fehlen des pEAF resultiert *in vitro* in der Formierung lockerer Mikrokolonien (*localized adherence-like*: LAL) auf HeLa- und HEp-2-Zellen (Trabulsi *et al.* 2002). Neben der Formierung von Mikrokolonien wurden sowohl Adhäsionsmuster wie diffuse Adhäsion (*diffus adherence*: DA) als auch aggregative Adhäsion von aEPEC auf HeLa-Zellen detektiert (Hernandes *et al.* 2006).

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) und Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC). Neben wässriger und leicht blutiger Diarrhö sind EHEC die Ursache hämorrhagischer Colitis (HC). Bei 5% der EHEC-Infektionen kommt es zur Ausbildung des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) (Karch *et al.* 2005; Kayser *et al.* 2010). Vor allem immungeschwächte Patienten wie Kleinkinder und ältere Menschen sind unter diesen 5% der schweren Krankheitsverläufe (Nataro und Kaper 1998; Noris und Remuzzi 2005; Yoon und Hovde 2008). Bereits eine sehr niedrige Infektionsdosis von 10 bis 100 Erregern kann zur Erkrankung des Wirtes führen (Nataro und Kaper 1998). Der Infektionsmechanismus der STEC erfolgt durch Freisetzen von Toxinen, welche eukaryotische Zellen schädigen (Kolling und Matthews 1999; Yokoyama *et al.* 2000; Kesty *et al.* 2004). Shigatoxine sind in der Lage, Epithelzellen zu passieren und Endothelzellen zu zerstören (Erwert *et al.* 2003; Schüller 2011).

STEC exprimieren ein oder mehrere Toxine der Stx-Familie, welche von den VAGs *stx1* und/oder *stx2* kodiert werden. EHEC, deren Pathogenität im Vergleich zu STEC wesentlich ausgeprägter ist, bilden eine LEE (Intimin)-positive A/E-Läsionen verursachende Subgruppe der STEC. In EHEC

können die VAGs *stx1* und/oder *stx2* und *eaeA* nachgewiesen werden (Schmidt 2010). Analysen zeigten, dass vor allem Stx2a, c und d mit HC und HUS assoziiert sind (Nataro und Kaper 1998; Boerlin *et al.* 1999; Friedrich *et al.* 2002). Stx2e ist vornehmlich mit der Infektion von Schweinen assoziiert (Weinstein *et al.* 1988; Sonntag *et al.* 2005).

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC). EAEC bilden eine heterogene Gruppe, die sowohl pathogene als auch nichtpathogene Stämme enthält. Eine Infektion mit EAEC ist sowohl mit akuter oder chronischer Diarrhö besonders von Kindern in Entwicklungsländern als auch mit immunsupprimierten Erwachsenen assoziiert. EAEC-Infektionen zählen mit zu den häufigsten Ursachen von Reise-Diarrhö. Auch lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche in Industrieländern wurden auf EAEC zurückgeführt (Harrington *et al.* 2006). Die Bezeichnung „enteroaggregativ“ erfolgte in Abhängigkeit des charakteristischen „backsteinartigen“ Adhäsionsmusters der Bakterien auf HEp-2-Zellen (*aggregative adherence: AA*)(Nataro *et al.* 1987). Das charakteristische Regulatorprotein der EAEC ist AggR, kodiert vom pAA-plasmidkodierten inVAG *aggR* (Dudley *et al.* 2006).

Enterotoxische *E. coli* (ETEC). Eine Infektion mit ETEC beginnt meist plötzlich mit wässrig-blutiger Diarrhö, Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen und zeigt im Verlauf der Infektion chole-räähnliche Symptome. Besonders Säuglinge und Kleinkinder in Entwicklungsländern, aber auch Reisende sind betroffen (Ramzan 2001; Davidson *et al.* 2002). Die Infektion verläuft weltweit in vielen Fällen letal. ETEC sind zudem bedeutende Erreger wässriger Diarrhö bei Rindern und Schweinen, wobei besonders Jungtiere betroffen sind (Nagy und Fekete 2005).

ETEC werden durch Virulenzfaktoren für hitzeempfindliche Enterotoxine (*heatlabile enterotoxins: LT*), die von Genen der *elt*-Gruppe kodiert werden und/oder hitzestabile Enterotoxine (*heatstable enterotoxins: ST*), die von Genen der *est*-Gruppe kodiert werden, charakterisiert (Levine 1987; Kaper *et al.* 2004). Es wird in Abhängigkeit der Struktur und des Wirkmechanismus jeweils zwischen zwei Klassen der LT- und ST- Proteine unterschieden. Sowohl ST1 als auch LT1 sind mit Infektionen in Menschen und Tieren assoziiert. ST2 und LT2 sind hingegen vornehmlich mit Infektionen von Tieren (ST2 hauptsächlich in Schweinen) assoziiert (Sears und Kaper 1996).

Diffus adhärenente *E. coli* (DAEC). Die Rolle der DAEC bei intestinalen Infektionen ist umstritten, da sie sowohl aus Patienten als auch aus gesunden Probanden isoliert wurden (Nataro und Kaper 1998; Servin 2005; Kayser *et al.* 2010). Meist wurden DAEC jedoch aus an Diarrhö erkrankten Kleinkindern isoliert (Le Bouguéneec und Servin 2006). Die Definition von DAEC erfolgte über deren typisches diffuses Adhäsionsmuster auf HEp-2- oder HeLa-Zellen (Nataro und Kaper 1998; Servin 2005). Zudem sind DAEC durch die nahezu homologen Afa/Dr/F1845-Adhäsine oder den Adhäsionsfaktor

AIDA-I charakterisiert (Servin 2005; Vidal *et al.* 2005). In 75% der isolierten DAEC ist das Fimbrienadhäsion F1845 kodierende inVAG *daaD* nachweisbar (Kaper *et al.* 2004), welches neben der Analyse des Adhäsionsmusters zur molekularen Charakterisierung der DAEC genutzt wird (Vidal *et al.* 2005). Zur Verdeutlichung der Klassen der DAEC dient Tab. 2. Typische Afa/Dr-DAEC exprimieren keine EPEC-typischen Virulenzfaktoren, wohingegen in einer Subklasse der atypischen DAEC homologe Sequenzen des EPEC-typischen LEE-Plasmids mit Genen für die Ausbildung von A/E-Läsionen nachgewiesen wurden (Servin 2005). In Tieren (Kälber, Schweine und Geflügel) wurden bisher nur DAEC der atypischen Subklasse 1 mit AfaE-VII (bovines Adhesin) und AfaE-VIII (humanes und tierisches Adhesin) nachgewiesen (Lalioui *et al.* 1999; Gerardin *et al.* 2000; Girardeau *et al.* 2003). F1845-Fimbrien enthaltende DAEC, bzw. DA-EPEC wurden bisher nur aus Menschen isoliert.

Tab. 2: Einteilung der DAEC in Subklassen nach Adhäsionsfaktoren und Rezeptoren (nach Servin 2005). Innerhalb dieser Arbeit wurden DAEC anhand des inVAGs *daaD* für den Adhäsionsfaktor F1845 und des exVAGs *afa/dra* für Afa/Dr-Adhäsionsfaktoren charakterisiert.

Typische DAEC vorwiegend Auslöser von Harnwegsinfekten		Atypische DAEC vorwiegend Auslöser von Diarrhö bei Kindern	
Adhäsionsfaktoren AfaE-I, AfaE-II, AfaE-III, AfaE-V, Dr, Dr-II, F1845, NFA-I		Adhäsionsfaktor AIDA-I	
Afa/Dr DAF Subklasse	Afa/Dr CEA Subklasse	Subklasse 1	Subklasse 2 (DA-EPEC)
Rezeptor: <i>human decay-accelerating factor</i> (DAF, CD55)	Rezeptor: <i>carcinoembryonic antigen related cellular adhesion molecules</i> (CEA, CEACAMs)	Expression von AfaE-VII, AfaE-VIII, AAF-I, AAF-II, AAF-III; binden nicht an humanem DAF	Expression von Afa/Dr oder anderen diffuse Adhesion induzierenden Adhesinen; enthalten LEE-Pathogenitätsinseln

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC). Dieser *E. coli*-Pathotyp unterscheidet sich nur anhand weniger biochemischer Tests von Shigellen. Essenzielle Virulenzfaktoren, wie z.B. das plasmidkodierte Ipa (*invasion plasmid antigen*, inVAG *ipaH*), sind in beiden Erregern enthalten (Kaper *et al.* 2004). Der infektiöse enteroinvasive Phänotyp ruft ähnliche Symptome wie die einer Shigelleninfektion hervor (Nataro und Kaper 1998; Sansonetti 2006). EIEC-Infektionen beginnen mit wässriger Diarrhö, krampfartigen Leibschmerzen, begleitet von Fieber und Schüttelfrost. Im weiteren Verlauf dringen die Erreger über M-Zellen in die Epithelzellen des Intestinaltraktes ein, lysieren die endozytotische Vakuole (Mounier *et al.* 1992), um sich intrazellulär zu vermehren und weitere Zellen zu kolonisieren (Goldberg und Sansonetti 1993). Eine Infektion geht in ruhrähnliche Diarrhö mit Blut, Mukus und Leukozyten im Stuhl über (Nataro und Kaper 1998).

2.3.2 Extraintestinal pathogene *Escherichia coli*

Eine eindeutige Zuordnung spezifischer molekulare Marker zu den einzelnen ExPEC-Gruppen war bisher nicht möglich. Es wurden uropathogene *E. coli* (UPEC), Neugeborenen-Meningitis verursachende *E. coli* (NMEC) und aviär pathogene *E. coli* (APEC) beschrieben. Eine Beschränkung von

ExPEC-Infektionen auf diese Bereiche besteht allerdings nicht, da auch Infektionen wie Pneumonien, Wundinfektionen und vertebrale Osteomyelitis assoziiert mit Abszessen des Epiduralraumes und der Muskeln *Musculus iliacus* und *M. psoas* auf *E. coli* zurückgeführt wurden (Johnson und Russo 2002). Die Vermehrung und Verbreitung der Bakterien im Blutstrom führt zur Sepsis. ExPEC verfügen über eine sehr hohe genetische Diversität mit einer erheblichen Varianz virulenzassoziierter Faktoren, wie Adhäsinen, Invasinen, Toxinen, Siderophoren, Lipopolysacchariden, Polysaccharidkapseln und Invasinen (Nataro und Kaper 1998; Belanger *et al.* 2011). ExPEC sind zumeist kommensale *E. coli* des Intestinaltraktes, die erst nach Besiedlung extraintestinaler Areale pathogen wirken (Abe *et al.* 2008). Von Infektionen sind nicht nur Menschen, sondern auch Zuchttiere wie Rinder, Schweine und Geflügel, sowie Haustiere, z.B. Hunde und Katzen, betroffen (Smith *et al.* 2007; Belanger *et al.* 2011).

Uropathogene *E. coli* (UPEC). Zwischen 70 bis 80% der akuten und 30 bis 40% der chronischen Infektionen der unteren Harnwege (Urethritis, Zystitis, Urothrozystitis), des Nierenbeckens und der Niere (Pyelonephritis) sind die Folge einer Infektion mit *E. coli* (Kayser *et al.* 2010). Die Translokation der im Intestinaltrakt angesiedelten potentiellen UPEC erfolgt über komplexe Mechanismen, welche durch eine hohe Anzahl virulenzassoziierter Faktoren vermittelt wird (Tab. 1).

Es wird davon ausgegangen, dass eine Infektion die Adhäsion der UPEC an Uro-Epithelzellen voraussetzt. Diese wird im unteren Harnwegsabschnitt, bzw. zu Beginn der Infektion, zumeist von Typ1-Fimbrien (*fim*) und im Verlauf der Infektion in der Harnblase von P-Fimbrien (*pap*) vermittelt (Snyder *et al.* 2005). Typ1-Fimbrien sind filamentöse Oberflächenstrukturen, die mit der äußeren Membran der Bakterien verankert sind. Diese Proteine wurden in über 95% aller intestinalen und extaintestinalen *E. coli*-Isolate und auch in anderen *Enterobacteriaceae* nachgewiesen (Belanger *et al.* 2011). Sie vermitteln die Adhäsion kommensaler *E. coli* an Epithelzellen des Darmes (Hendrickson *et al.* 1999). Typ1-Fimbrien wurde zudem eine Schlüsselrolle bei der initialen Etablierung von Harnwegsinfekten zugeschrieben. Während das Adhäsin dieser Fimbrien (FimH) kommensaler *E. coli* mit hoher Affinität an Trimannosereste bindet, zeigen uropathogene *E. coli* (UPEC) eine höhere Affinität zu Monomannoseresten (Zhou *et al.* 2001), was besonders für die unteren Harnwege (Blase und Harnleiter) relevant ist (Martinez *et al.* 2000).

Pyelonephritis-assoziierte (P)-Fimbrien sind zumeist spezifisch mit durch UPEC induzierten Infektionen assoziiert (Connell *et al.* 1993; Lane und Mobley 2007; Kayser *et al.* 2010). Sie binden nicht nur an das P-Blutgruppenantigen (Belanger *et al.* 2011), sondern auch spezifisch an Globotriaosylceramid (Gb3)-Rezeptoren, die sowohl auf Zellen der oberen Harnwege (Harnleiter, Niere), als auch auf bestimmten humanen intestinalen Epithelzellen und Zelllinien präsentiert werden (Kuehn *et al.* 1992; Schüller 2011).

S- (*sfa*) und F1C- (*foc*) Fimbrien sind in der äußeren Bakterienmembran verankerte filamentöse Oberflächenstrukturen. S-Fimbrien zeigen morphologische Ähnlichkeit zu Typ1- und P-Fimbrien (Korhonen *et al.* 1984). Die homologen Sequenzbereiche von S- und F1C-Fimbrien werden häufig gekoppelt nachgewiesen (exVAGs *sfa/foc*). Die Antigene der S- und F1C-Fimbrien differieren jedoch bezüglich deren Rezeptorspezifität (Ott *et al.* 1988). S-Fimbrien sind mit Neuraminsäure (Sialylgalactoside) assoziiert (Antao *et al.* 2009). Sie adhären an humanen Blasen- und Nierenepithelzellen. Es wurde zudem auch eine Affinität zu neuronalen Endothelzellen, zu Colon- und Ileumenterozyten nachgewiesen (zusammengefasst in (Antao *et al.* 2009). Dies lässt auf deren Assoziation zu NMEC schließen. F1C-Fimbrien sind mit Galactosylceramid enthaltenden Glykolipiden assoziiert (Virkola *et al.* 1988; Antao *et al.* 2009) und wurden in 14 bis 38% der UPEC detektiert. Es wurde ein Einfluss auf die Biofilmformation und somit die Kolonisation und Persistenz sowohl in intestinalen Arealen als auch im Urinaltrakt nachgewiesen (Snyder *et al.* 2005; Lasaro *et al.* 2009; Hancock *et al.* 2011).

Prävalenzstudien afimbriärer Adhäsine der Afa/Dr/F1845-Gruppe, typisch für DAEC, detektierten diese ebenfalls in UPEC (6,1-12,6%), jedoch auch in APEC (1,3-8,2%) und NMEC (3,8-25,6%) (Ewers *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2008).

Mittels Siderophoren sind UPEC in der Lage, den Eisenvorrat des Wirtes zu nutzen. Häufig nachgewiesene Gene für Siderophore sind *iutA*, *iro*, *chu*, *fyuA*, *sit* oder *ent*. Zudem können UPEC durch die Expression von Toxinen umfangreiche Gewebeschäden hervorrufen, wodurch es zur Nährstoffaquisition und zur Verbreitung der Bakterien kommt. Zusätzlich bewirken UPEC dadurch die Deaktivierung der Immunzellen des Wirtes. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Toxine α -Hämolyysin (*hly*), der zytotoxisch-nekrotisierende Faktor Cnf1 (*cnf1*), das Serin-Protease Autotransporter Toxin Sat (*sat*) und das *vacuolating autotransporter toxin* Vat (*vat*) (Smith *et al.* 2008; Wiles *et al.* 2008a). Auch K1-Kapselantigene, weitere Adhäsine, Invasine, Lipopolysaccharide und Polysaccharidkapseln sind in die Pathogenese der UPEC involviert (Abe *et al.* 2008). Zudem wurde festgestellt, dass UPEC nicht das Typ-III-Sekretionssystem nutzen, sondern oft Typ-I- und Typ-V-Sekretionssysteme (Henderson *et al.* 2004).

Neugeborenen-Meningitis verursachende *E. coli* (NMEC). NMEC sind kommensal im Intestinaltrakt siedelnde *E. coli*, welche mittels komplexer Mechanismen zur Translokation über den Blutstrom, zum Passieren der Blut-Hirn-Schranke und zum Eindringen in das Zentralnervensystem in der Lage sind. Dort angekommen verursachen sie Ödeme, meningeale Entzündungen und Pleozytose der Cerebrospinalflüssigkeit. Die Infektionsrate von Neugeborenen mit NMEC liegt bei 1:2.000-4.000 Kindern. Bis zu 40% der mit NMEC infizierten Neugeborenen erliegen einer Infektion (Bonacorsi und

Bingen 2005). Überlebende haben zumeist schwere neurologische Folgeerscheinungen (Croxen und Finlay 2010). Die Übertragung der NMEC erfolgt während der Entbindung von der Mutter auf das Kind. Die Vermehrung der Bakterien im Blutstrom des Kindes führt zur Sepsis.

NMEC schützt sich vor der Immunantwort des Wirtes durch die Expression antiphagozytotischer Kapseln, Serumresistenz, Invasion und Vermehrung in Makrophagen und Monozyten sowie Freisetzung von Toxinen (Croxen und Finlay 2010). K1-Kapselantigene, Homopolymere der N-Acetylneuraminsäure (*neuC*), werden in etwa 80% der NMEC synthetisiert und tragen hauptsächlich zur Protektion der NMEC im Wirt bei (Kim *et al.* 1992). In intestinalen *E. coli* wurde das exVAG *neuC* lediglich in 20 bis 40% der Isolate nachgewiesen. Die Adhäsion der NMEC an die microvaskulären Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke wird durch FimH und OmpA vermittelt (Prasadarao 2002; Khan *et al.* 2007). Die Invasion der Bakterien erfolgt u.a. mit Hilfe der Proteine Ibe, FimH, OmpA und Cnf1 (Kim 2008). Auch S-Fimbrien wurden sehr häufig in meningitis- und sepsisassoziierten *E. coli*-Isolaten detektiert (Ott *et al.* 1986).

Aviär pathogene *E. coli* (APEC). APEC verursachen in Vögeln das Krankheitsbild der Colibazillose, wobei am häufigsten Infektionen des Respirationstraktes auftreten. Durch die Verbreitung des Erregers über die Blutbahn kommt es im weiteren Verlauf der Infektion zu Septikämien und zum Befall der inneren Organe, des Bauchfells, der Eileiter, Hirnhäute und Gelenke (Janßen *et al.* 2001; Ewers *et al.* 2007). APEC Infektionen verursachen weltweit erhebliche wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie (Ewers *et al.* 2007). Ein hohes zoonotisches Risiko besteht durch die Übertragung von APEC über kontaminiertes Geflügelfleisch (Johnson und Russo 2005; Rodriguez-Siek *et al.* 2005; Ewers *et al.* 2007). In APEC wurde eine Vielfalt an VAGs nachgewiesen, welche auch in anderen ExPEC enthalten sind. Unterschiede zu NMEC und UPEC wurden in der höheren Prävalenz der exVAGs *tsh*, *iucD* und *iroN*, *cvi/cva*, *iss* und *traT* analysiert (Johnson und Russo 2002; Johnson *et al.* 2006; Ewers *et al.* 2007). Im Gegensatz zu NMEC und UPEC wurde Cnf1 in APEC signifikant seltener nachgewiesen (Rodriguez-Siek *et al.* 2005; Ewers *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2008).

2.4 Hämolytische *Escherichia coli*

In *E. coli* wurden α -, β - und γ -Hämolysine differenziert (Smith 1963; Walton und Smith 1969). Die α - und β -Hämolysen bewirkt die Ausbildung eines transparenten Hofes um eine entsprechende Bakterienkolonie auf Blutagarplatten. Das γ -Hämolysin ist nicht in der Lage, humane und Kaninchenerythrozyten zu hämolysieren, zerstört jedoch Erythrozyten anderer Spezies. Das Toxin α -Hämolysin wird vom exVAG *hlyA* kodiert. Untersuchungen zur Funktionalität des α -Hämolysins zeigten, dass dessen Wirkung nicht auf Erythrozyten beschränkt ist, sondern dass dieses weitere Zellen wie z.B.

Lymphozyten und Fibroblasten lysieren kann. α -Hämolyisin wirkt demnach zytotoxisch (Cavalieri *et al.* 1984; Madigan *et al.* 2006). Es ist in der Lage, Poren, sogenannte *focal leaks*, in den Membranen verschiedener Säugerzellen auszubilden (Welch 1991). Troeger *et al.* postulierten in diesem Zusammenhang eine Begünstigung der Translokation von α -Hämolyisin-positiven Bakterien, insbesondere von ExPEC, in extraintestinale Areale und die Blutbahn (Troeger *et al.* 2007). Die *focal leaks* wurden zudem auch als mögliche Anheftungsstellen für *E. coli* diskutiert. Anhaftende Bakterien könnten weitere Bakterien anlocken und so deren Kolonisation stimulieren (Schierack 2010). Zudem wurde Hämolyse mit erhöhter Prävalenz von VAGs und Pathogenität assoziiert (Frydendahl 2002).

Die Diskussion über die Funktion des α -Hämolyisins als Virulenzfaktor und als Kolonisationsfaktor wird recht kontrovers geführt. So gibt es Studien, die hämolytische Aktivität von Isolaten aus gesunden Menschen oder Schweinen nachwiesen, wodurch das Vorliegen des Hämolyisin-Operons keinen Rückschluss auf Pathogenität zuließe (Nowrouzian *et al.* 2003; Chapman *et al.* 2006; Schierack *et al.* 2006; Schierack *et al.* 2008). Auch wurde in einer Studie an gnotobiotischen Schweinen nach Inaktivierung des α -Hämolyisins eines ETEC keine Verringerung dessen Inzidenz einer Septikämie nachgewiesen (Moxley *et al.* 1998). Auch Connell *et al.* konnten in ihrer Studie keinen signifikanten Einfluss des Hämolyisins auf akute Harnwegsinfektionen nachweisen (Connell *et al.* 1993). Zudem wurde in verschiedenen Tiermodellen die Assoziation der Hämolyisinproduktion mit erhöhter Kolonisation der Harnwege beschrieben (Johnson 1991). Dem gegenüber ist allgemein anerkannt, dass die Hämolyse ein Merkmal fast aller Diarrhö verursachenden *E. coli* ist (Nagy und Fekete 1999). Hämolytische Isolate wurden häufig aus Exkrementen an Diarrhö erkrankter Menschen, Zucht- und Wildtiere isoliert (Johnson 1991; Ewers *et al.* 2009b). Es wurde experimentell gezeigt, dass hämolytische Stämme stärker letal auf Hühnerembryos, Mäuse und Ratten wirkten (Johnson 1991). Zudem zerstörte das α -Hämolyisin Epithelzellen des Urinaltraktes in Mäusen und führte zu Entzündungen, Nekrosen und Zellhyperplasien im Kaninchenmodell (O'Hanley *et al.* 1991; Elliott *et al.* 1998; Smith *et al.* 2008). Auffällig jedoch ist der Nachweis des α -Hämolyisins in ca. 50% der UPEC, wobei hier wiederum die Expression mit der Ausprägung von Infektionen des Urinaltraktes assoziiert war (Johnson 1991). Die vielfältige Wirkung von α -Hämolyisin vermittelt den Verdacht einer Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit dieses Toxins. Es ist nicht geklärt, welche Toxindosis für die Lyse von Zielzellen während des Verlaufs einer akuten Infektion nötig ist (Wiles *et al.* 2008b). Jedoch wurden für sublytische Konzentrationen des Toxins Einflüsse auf zellphysiologisch relevante Vorgänge des Wirtes beschrieben (Wiles *et al.* 2008a; Wiles *et al.* 2008b; Dhakal und Mulvey 2012).

2.5 Methoden zur Typisierung von Bakterien

Während des letzten Jahrzehnts wurden die Methoden der molekularen Biologie zur Analyse und zum Vergleich bakterieller Isolate durch technologische Fortschritte wesentlich verbessert, wobei als neueste Methode die vollständige Sequenzierung der Stämme zur Verfügung steht (Margulies *et al.* 2005). Da die Sequenzierung kompletter Genome momentan noch keine praktikable Lösung für die Analyse großer Mengen an Isolaten darstellt, werden in den meisten Studien mehrere verschiedene klassische Methoden kombiniert. Die Basis der Analysen ist nach wie vor die Bakterienkultur auf Selektivnährböden und die darauf folgende makroskopische Charakterisierung anhand biochemischer Reaktionen. Es folgen zumeist Methoden wie die Bestimmung des Serotyps (Kauffmann 1947) und der phylogenetischen Gruppierung (Clermont *et al.* 2000), Multilocussequenztypisierung (MLST) (Wirth *et al.* 2006) oder Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) (Tenover *et al.* 1995; Ribot *et al.* 2006). Weitere Methoden sind die Analyse von *single nucleotide* Polymorphismen (SNP), Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) oder *randomly amplified polymorphic DNA Analysis* (RAPD) (Power 1996; Chansiripornchai *et al.* 2001). Der Multilocusenzymelektrophorese (MLEE) wird die geringste Differenzierungseffizienz zugeschrieben (Selander *et al.* 1986; Stanley und Wilson 2003; Wirth *et al.* 2006). Plasmide und Gene können neben dem Nachweis durch mPCRs mittels Mikroarray charakterisiert werden (Bekal *et al.* 2003; Garrido *et al.* 2006; Hamelin *et al.* 2007). Ein Überblick über die Methoden wurde 2011 als Buchbeitrag veröffentlicht (Frömmel *et al.* 2011).

Für die schnelle und simultane Detektion unterschiedlicher Parameter werden bioanalytische Technologien entwickelt, die diesem hohen Anspruch spezifisch und sensitiv gerecht werden. Mit Lab-on-Chip-Systemen ist es heute bereits möglich, zeitnahe und schnelle Multiparameteranalysen klinischer Parameter auf kleinstem Raum unabhängig von aufwändigen und kostenintensiven Laboranalysen durchzuführen (Bier und Schumacher 2011; Schumacher *et al.* 2012). In der Hochschule Lausitz wurde mit der VideoScan-Technologie eine vielseitig einsetzbare Plattform für die Multiparameterdiagnostik auf der Basis der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt. Diese Technologie vereint kommerziell erhältliche Standardhardwarekomponenten mit einer modular aufgebauten Software. Die Technologie erlaubt die Identifizierung und Quantifizierung von Biomolekülen sowohl in Lösung als auch gekoppelt an Mikropartikel (Frömmel *et al.* 2011; Grossmann *et al.* 2011; Rödiger *et al.* 2011; Frömmel *et al.* 2013b). Außerdem sind mittels spezieller Bildverarbeitungsfunktionen High Content Screenings von Autoimmunantikörpern auf immobilisierten Zellen (Hiemann *et al.* 2009) sowie Screenings zur Ermittlung der Adhäsionsrate und der Zytotoxizität von Bakterien auf Epithelzelllinien möglich (Frömmel *et al.* 2013a; Frömmel *et al.* 2013b).

2.6 Zielstellung

Ziel meiner Arbeit war die Etablierung von Screeningmethoden zur umfassenden Charakterisierung von *E. coli*-Populationen. Dies beinhaltete die Entwicklung von:

1) mikropartikelbasierten Multiplex-PCR-Assays zur genotypischen Beschreibung von *E. coli*. Angewendet wurden die Assays zum Nachweis von 44 virulenzassoziierten Genen (VAGs) und zur Charakterisierung der Phylogenie von 398 *E. coli*-Isolaten aus 13 Wildsäuger- und 5 Wildvogelarten sowie aus gesunden und harnwegserkrankten Menschen und Hausschweinen.

2) zellkulturbasierten Adhäsionsassays einschließlich neuer Färbeprotokolle zur Beschreibung von Adhäsionsmustern und zur Quantifizierung adhärenter Bakterien auf fünf Zelllinien (humane Colonepithelzellen Caco-2, humane Harnblasenepithelzellen 5637, humane Kehlkopfepithelzellen HEp-2, porcine Jejunumepithelzellen IPEC-J2, porcine Nierenepithelzellen PK-15) und

3) zellkulturbasierten Assays zur Beschreibung der Zytotoxizität des *E. coli*- α -Hämolysins gegenüber humanen Colonepithelzellen LoVo sowie 5637-, IPEC-J2- und PK-15-Zellen.

Die Screeningmethoden sollten es ermöglichen, einen Überblick über das Vorkommen, die Verbreitung und der Reservoir pathogener *E. coli* zu erhalten. Weiterin sollten Aussagen zur wirts-, zell- oder gewebespezifischen Adhäsion kommensaler und pathogener *E. coli* einen Überblick über die damit verbundene Ausprägung von Besiedlungs- und Infektionsmustern verschaffen. In diesem Zusammenhang war es wichtig, den Einfluss von exVAGs auf die Adhäsion und damit die Kolonisierung des Intestinums zu untersuchen und zu analysieren, ob bestimmte exVAGs oder inVAGs mit erhöhter Adhäsion assoziiert sind. Ebenso sollte die biologische Aktivität des *E. coli*- α -Hämolysins genauer charakterisiert werden. Letztendlich sollten Unterschiede zwischen kommensalen und pathogenen *E. coli* und ein mögliches Zoonosepotential pathogener Isolate identifiziert werden.

3. Material

3.1 Bakterienstämme

Tab. 3: *E. coli*-Isolate. Nicht hämolytische (H-) und hämolytische (H+) Isolate aus Mensch, Hausschwein und Wildtierarten und deren Quelle. Alle Isolate gehören zur Stammsammlung von Prof. Peter Schierack. UTI: urinary tract infection.

Arten		Anzahl Isolate H-	Anzahl Isolate H+
<i>Homo sapiens</i>	Mensch, gesund	19 ^(a,b)	13 ^(a,b)
<i>Homo sapiens</i>	Mensch, UTI	20 ^(c)	13 ^(c)
<i>Sus scrofa domestica</i>	Hausschwein, gesund	22 ^(d)	13 ^(d)
<i>Sus scrofa domestica</i>	Hausschwein, UTI	15 ^(e)	--
Wildtiere Säuger			
<i>Capreolus capreolus</i>	Reh	23 ^(f,g)	8 ^(f,g)
<i>Erinaceus europaeus</i>	Braunbrustigel	22 ^(f)	--
<i>Lepus europaeus</i>	Feldhase	8 ^(f)	--
<i>Lutra lutra</i>	Fischotter	7 ^(f)	--
<i>Martes sp.</i>	Marder	19 ^(f)	6 ^(f)
<i>Meles meles</i>	Dachs	7 ^(f)	--
<i>Mus musculus</i>	Hausmaus	9 ^(f)	--
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Wildkaninchen	6 ^(f)	--
<i>Procyon lotor</i>	Waschbär	22 ^(f)	10 ^(f)
<i>Rattus norvegicus</i>	Wanderratte	4 ^(f)	--
<i>Sciurus vulgaris</i>	Eichhörnchen	17 ^(f)	--
<i>Sus scrofa</i>	Wildschwein	22 ^(f,g)	--
<i>Vulpes vulpes</i>	Rotfuchs	21 ^(f)	5 ^(f)
Wildtiere Vögel			
<i>Accipiter nisus</i>	Sperber	13 ^(f)	--
<i>Anas platyrhynchos</i>	Stockente	--	13 ^(h)
<i>Asio otus</i>	Waldohreule	5 ^(f)	--
<i>Buteo buteo</i>	Mäusebussard	14 ^(f)	--
<i>Turdus merula</i>	Amsel	22 ^(f)	--

^(a)Isolate wurden von Thomas Wex, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg zur Verfügung gestellt. ^(b)Isolate wurden von Peter Schierack von Menschen aus dem Arbeitsumfeld gesammelt. ^(c)Isolate wurden aus Urinproben von Patienten mit Harnwegsinfekten im Lausitzer Seenland Klinikum GmbH Hoyerswerda 2009 von Steffen Vogel isoliert. ^(d)Isolate wurden von Peter Schierack in 18 verschiedenen Schweinemastanlagen im Osten Deutschlands zwischen 2009 und 2010 gesammelt. ^(e)Isolate wurden von Per Klemm, Technische Universität Dänemark in Lyngby, aus Urinproben von Schweinen mit Pyelonephritis in einer Tierklinik gesammelt. ^(f)Isolate wurden zwischen 2007 und 2011 in der Lausitz gesammelt: a) von Peter Schierack von verunfallten Tieren, b) vom Senckenberg Museum Görlitz und c) vom Museum der Westlausitz Kamenz. ^(g)Isolate wurden von Peter Schierack von erjagten Tieren während der Jagdsaisons im Forst Casel/Drebkau zwischen 2007 und 2010 gesammelt. ^(h)Isolate wurden von Peter Schierack in den Wintern 2007/2008 bis 2010/2011 an der Schwarzen Elster in Hoyerswerda gesammelt.

Tab. 4: *E. coli*-Stämme als Kontrollen für Adhäsionsassays auf den Zelllinien Caco-2, 5637, IPEC-J2 (Nissle 1917, 4305, 4308) und PK-15 (WS4408, WS28).

Bezeichnung	Beschreibung (nachgewiesene Gene)	Herkunft	Quelle
Nissle 1917	<i>sfa/foc, pic, sitchr, ompA, iroN, vat, iucD, iutA, mat, fyuA, sat, fimC, irp2, chuA</i>	Mensch	Mutaflor®; Ardeypharm, Herdecke; Nissle, 1918
4305	<i>traT, ompA, astA, mat, csgA, fimC, yjaA</i>	Schwein	Frauendorf, Deutschland
4308	<i>ompA, iucD, malX, csgA, fimC, yjaA</i>	Schwein	Frauendorf, Deutschland
WS4408	<i>sfa/foc, hra, traT, ompA, iroN, sitep, tsh, iucD papC, iss, iutA, mat, fyuA, csgA, fimC, irp2, TSPE4C2</i>	Wildschwein	Weissenberg, Deutschland
WS28	<i>sfa/foc, pic, sitchr, ompA, malX, fimC, irp2, chuA, yjaA, TSPE4C2</i>	Wildschwein	Nochten, Deutschland

Tab. 5: Kontrollstämme für PCRs. Alle Stämme sind *E. coli* mit der Ausnahme von Stamm 1/38 (*Shigella dysenteriae*).

Bezeichnung	Beschreibung (nachgewiesene Gene)	Wirt	Quelle
IMT1200	<i>cnf1/2, iutA, mat, fyuA, sat, malX, csgA, fimC, irp2, ireA, tia</i>	Mensch	IHYT, Universität Gießen
IMT2470	<i>ibeA, traT, sitchr, ompA, iroN, sitep, vat, tsh, iucD, cvi/cva, papC, iss, astA, fimC, irp2, ireA, tia</i>	Huhn	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven (Ewers <i>et al.</i> 2007)
P2664	<i>hlyA, sfa/foc, pic, hra, chuA, yjaA, TSPE4C2</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
P5554	<i>hlyA, cnf1/2, mat, fyuA, malX, csgA</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
P6372	<i>hlyA, iucD</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
P6530	<i>hlyA, sitchr, ompA, iroN</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
P7465	<i>hlyA, ibeA, sitchr, ompA, iroN</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
IMT7920	<i>hlyA, afa/dra, sfa/foc, pic, hra, daaD</i>	Mensch	NFSTC-Michigan State University
IMT9267	<i>cnf1/2, mat, fyuA, malX, csgA</i>	Mensch	IMIB, Universität Würzburg
IMT0019	<i>fedA, est2, est1a, stx2e</i>	Schwein	IMIB, Universität Würzburg
IMT0204	<i>est1a, fanA, fimF41</i>	Rind	IHYT, Universität Gießen
Abbotstown	<i>est1a, est2, eltB1p, faeG, fasa</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
P232	<i>stx1, stx2</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
P860	<i>hlyA, chuA, yjaA, TSPE4C2</i>	Schwein	IHYT, Universität Gießen
5260	<i>aggR</i>	Mensch	Hameln Labor Hildesheim, Hameln
5283	<i>eaeA, bfp</i>	Mensch	Hameln Labor Hildesheim, Hameln
1/38	<i>ipaH</i>	Mensch	MPI für Infektionsbiologie, Berlin

3.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen BioTeZ Berlin-Buch GmbH und Eurofins MWG Operon Ebersberg bezogen. Die DNA-Sequenzen der PCR-Primer und Oligonukleotidsonden, Referenzen und PCR-Programme sind in Tab. 6 entsprechend ihrer Verwendung in mPCR-Assays aufgelistet.

Tab. 6: Sequenzen der Oligonukleotide, PCR-Fragmentlänge, Accession-Nr., Quelle und PCR-Programme.

Gene	Primer- und Sondensequenzen 5'-3'; f: vorwärts; r: rückwärts (5'-Cy5); p: Sonde (5'-Aminoheptyl + 10T)	Fragmentlänge (bp)	Accession	Quelle
mPCR 1	3 min bei 94°C; 40 Zyklen je 30 s bei 94°C, 30 s bei 52°C, 1 min bei 72°C; 5 min bei 72°C			
<i>afa/dra</i>	f TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG r CCGCCCTGAAGAAGTATCAC p TAAGTGGCGGGCTGACAGAT	210	FM955460.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>sfa/foc</i>	f CGGAGAACTGGGTGCATCTTA r ACGCATGTGCTTCATCATG p GGCAGATATAATGCCATTTAATTAAGGCTG	189	CP000247.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>pic</i>	f ACTGGATCTTAAGGCTCAGG r TTCCCCACAGAGTGTTAC p ATATTCTGAAATCTGCCAGC	168	AF097644.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>hra</i>	f GTAATCACACTGCTGCACCT r CGAATCGTTGTCACGTTTCAG p GGTACGTCATAGCGGACAC	139	CP000247.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>hlyA</i>	f GTCCATTGCCGATAAGTTT r ATAGCTCCTGTTTCTTTGTG p TGGTGACAGTTTACTTGCTGC	120	AE014075.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
mPCR 2	3 min bei 94°C; 35 Zyklen je 30 s bei 94°C, 30 s bei 53°C, 1 min bei 72°C; 5 min bei 72°C			
<i>sitep</i>	f CCAGGGGCGAGTCACTAAATG r TACGGCAGTGAGAGCAGAGA p AGCACCGCCGGACATCAGCGC	190	CP001856.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>ompA</i>	f GGTGTTGCCAGTAACCGG r GACGGTCCGTAGTTGTTCTG p ATAAGCGTCAGAACCGATGC	177	CP002797.2	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)

Gene	Primer- und Sondensequenzen 5'-3'; f: vorwärts; r: rückwärts (5'-Cy5); p: Sonde (5'-Aminohexyl + 10T)	Fragmentlänge (bp)	Accession	Quelle
<i>iroN</i>	f ATCCTCTGGTCGCTAACTG r TTTTAATATCCTCGCTGGTAA p CAGCAGCCGGGCGTGTCGGT	167	CP002212.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>sitchr</i>	f GCCGGTTGTACGTTCTTCAT r ATCAGGCTTGCCACATCC p CGGTTTTGATCCGCGAGCTTG	140	CP002212.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>traT</i>	f GTGGTGCGATGAGCACAG r TCAGACGTGTTTTGATCTGC p CGCCAGCGAACGCACGGTAT	124	JN232517.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>ibeA</i>	f TGGAACCCGCTCGTAATATAC r AGTAGCTGCGCCTTCACG p TGCCGACGAATGAGTGCCGC	113	CP002167.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
mPCR 3	3 min bei 94°C; 40 Zyklen je 30 s bei 94°C, 30 s bei 52°C, 1 min bei 72°C; 5 min bei 72°C			
<i>vat</i>	f GTGTGACAACGGAATTGTC r GGGTATCTGTATCATGGCAAG p CCGGGGTTGCTTTATTTGAGAAATTAATATTTCCC	230	CP000468	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>tsh</i>	f TGGTGAATGCCATTTATGG r CTTCCGATGTTCTGAACGT p TAATGAAGACAATGATGCC	215	DQ381420	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>iucD</i>	f CCTGATCCAGATGATGCTC r CTGGATGAGCAGAAAATGACA p TGGTCAGTAAAGAATCGGCAGTGATGCC	193	CP002797	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>cvi/cva</i>	f CGCAGCATAGTTCATGCT r GCAATTTGTTGCAGGAGGA p TCATATATTGCACCTCCAGCCACACCCC	172	CP000836	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>papC</i>	f GCTCCATGGTCATATAGTTTCG r TGATATCACGCAGTCAGTAGC p ACGTCTCTCTCCCTCAATACG	155	CP002797.2	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>iss</i>	f GGACAAGAGAAAAGTGTGATGC r CAGCGGAGTATAGATGCCA p CCAGTTATGCATCGTGCATATGG	129	FJ824853.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>astA</i>	f TGCCATCAACACAGTATATCC r TCAGGTCGCGAGTGACGGC p CCAGTTATGCATCGTGCATATGG	116	FN554767.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007a) (Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
mPCR 4	3 min bei 94°C; 40 Zyklen je 30 s bei 94°C, 30 s bei 52°C, 1 min bei 72°C; 5 min bei 72°C			
<i>cnf1/2</i>	f CTTTACAATATTGACATGCTG r TCGTTATAAAATCAAACAGTG p GATCCCCATACTGGAAGCAATAATCCCC	446	CP001162.1	(Ewers <i>et al.</i> 2004) (Ewers <i>et al.</i> 2004) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>iutA</i>	f GGCTGGACATCATGGGAAGTGG r CGTCGGGAACGGGTAGAATCG p CTTTTCTGGGACAGGAGCTG	300	CU928164.2	(Chapman <i>et al.</i> 2006) (Chapman <i>et al.</i> 2006) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>mat</i>	f TATACGCTGGACTGAGTCGTG r GCCTGGAGTTTACTGAACCAA p GCAGAGGCCAAGCTGTACTC	257	AF325731.1	(Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>fyuA</i>	f GCGACGGGAAGCGATGACTTA r GTATTTCCCACTCAGGGTCTGG p CCGTAAGCTGTCGATCAGCGATGG	243	CU928163.2	(Schubert <i>et al.</i> 1998) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>sat</i>	f GTTCACAAATGGGGGAAATG r TTGAACATTCAGAGTACCGGG p GTAAACTGGAATGCATTGTATTCCAGTG	220	CU928164.2	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Ewers <i>et al.</i> 2007) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>malX</i>	f AACTTAGCAGAGCAATGGG r TTGAACGGTATCTGTATGCC p TTAGTCCATTAATACTTTGGTACGAA	200	AE014075.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>csgA</i>	f GCTGCGTTACGATGGAAAGT r GATAACAGCGTATTTACGTGGG p CTCACCCGCGGTTGTATTTTCTTTTTAGTTCATACC	118	CP001637.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)

Gene	Primer- und Sondensequenzen 5'-3'; f: vorwärts; r: rückwärts (5'-Cy5); p: Sonde (5'-Aminohexyl + 10T)	Fragmentlänge (bp)	Accession	Quelle
mPCR 5 3 min für 94°C; 35 Zyklen je 30 s bei 94°C, 30 s bei 57°C, 1 min bei 72°C; 5 min bei 72°C				
<i>fimC</i>	f GTTTTATCGTGACGCCACCT r TTCCTGCATCAGAAGGCAAT p ACAGAGTTGAATGCCGGAACCTCGG	402-8	CP000468	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>irp2</i>	f GCCATCAGGAGGAAGAATGA r GGCCTACTTTTCGGTCATGTT p CGGAAGAAGAAACGCCGCC	353-7	CP000468	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>ireA</i>	f GTTTCAGTCCCTGTTTCCA r ATGCAGCAACGGATTCTCTC p CATGATTATCGAGACGCAGTCTCCAG	237	CP000468	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>tia</i>	f CGAGTAATGCAACGCAGAAA r CATGGGTGTCTGTTGGACTG p GTATATGTTGCCTTATGATGTATCCGTGC	113	CP000468	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
mPCR 6 3 min für 94°C; 35 Zyklen je 60 s bei 94°C, 60 s bei 55°C, 90 s bei 72°C; 5 min bei 72°C				
<i>stx2e</i>	f GGAGCGTTTTGACCATCTTC r CGCCAGATATGATGAAACCA p CAAATCAGTCGTCACCTACT	247	M21534.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>fasA</i>	f CTGCCAAGTCATTTGCAGTT r AATCCGCCATTTGATACCAC p GCTGTGGAATTGGTACTGA	225	M35257.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>eltB1p</i>	f TTCGGAATATCGCAACACAC r TGGTCTCGGTACAGATATGT p GCCATTGAAAGGATGAAGGAC	214	M17873.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Casey und Bosworth 2009) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>fimF41a</i>	f CAAAAGCTGAAATGGCTGGT r GACCCGCAACATCCTTATTT p GGTGTTTCTGCAGGTAGTAC	200	M21788.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>faeG</i>	f ACCAATGGTGGAAACAAACT r TTCACCATCAGGGTTTCTGA p TGAAGGAGCTTCTGTAGTAC	173	M35954.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>fedA</i>	f TGCTTCTGTCCACTAAAACA r TGCTATTCGACGCCTTAACC p AAACCGTGAACGGTAAAACAC	157	M61713.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>est1</i>	f CAACTGAATCACTTGACTCTTC r CAGCACAGGCAGGATTACAA p GAACAACACATTTTACTGCTGT	147	V00612.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>est2</i>	f CTATTGCTACAAATGCCTATGC r CTCCAGCAGTACCATCTCTA p GACAAATAGCCAAGGAAAGTTG	126	M35586.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Casey und Bosworth 2009) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>fanA</i>	f TTGTTCAGGGAGAACTTGTT r AGGGCGTAAATACCCCTAGAA p GTGGAGTTATCAAGTATACGTAG	110	X05797.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
mPCR 7 3 min für 94°C; 35 Zyklen je 60 s bei 94°C, 60 s bei 55°C, 90 s bei 72°C; 5 min bei 72°C				
<i>ipaH</i>	f GTTCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC r GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC p CCATGGCATGCTGTACTGAA	619	M32063	(Guion <i>et al.</i> 2008) (Guion <i>et al.</i> 2008) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>daaD</i>	f TGAACGGGAGTATAAGGAAGATG r GTCCGCCATCACATCAAAA p GGAAGGGGGTGTGCGAGGCCCGGT	371	AY525531.1	(Guion <i>et al.</i> 2008) (Guion <i>et al.</i> 2008) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>eltB</i>	f TCTCTATGTGCATACGGAGC r CCATACTGATTGCCCAAT p GGAATAATAAAAACCCCAATTC	322	EU113252.1	(Guion <i>et al.</i> 2008) (Guion <i>et al.</i> 2008) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>eaeA</i>	f CCTGGTTACAACATTATGGAACG r TGAATAAGTCTCGCCAGTATTCG p GGGCTATAACGTCTTCATTGATC	287	AJ308550.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)

Gene	Primer- und Sondensequenzen 5'-3'; f: vorwärts; r: rückwärts (5'-Cy5); p: Sonde (5'-Aminohexyl + 10T)	Fragmentlänge (bp)	Accession	Quelle
<i>stx2</i>	f GGCACGTCTGAAACTGCTCC r TCGCCAGTTATCTGACATTCTG p CGCCGTGAATGAAGAGAGTCAA	255	FN252459	(Guion <i>et al.</i> 2008) (Guion <i>et al.</i> 2008) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>aggR</i>	f CGTAAGCCGGGTATGAAAGA r GCCAGTTCAGAAGCAGGAAC p CTGGAAGGAACTCTCAATGCTG	188	Z32523.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>est1</i>	f TTCCCTCTTTTAGTCAGTCAA r GCAGGATTACAACAATTACAGCAG p TCAGAAAATATGAACAACACATTT	159	siehe Guion et al. 2008	(Guion <i>et al.</i> 2008) (Guion <i>et al.</i> 2008) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>stx1</i>	f CTGGATTTAATGTGCGCATAGTG r AGAACGCCCACTGAGATCATC p CAGAGGGGATTTCTGTACAACAC	150	HM367099.1	(Guion <i>et al.</i> 2008) (Guion <i>et al.</i> 2008) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>est2</i>	f CTATTGCTACAAATGCCTATGC r CTCCAGCAGTACCATCTCTA p GACAAATAGCCAAGGAAAGTTG	126	M35586.1	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Casey und Bosworth 2009) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
mPCR 8 ECOR 3 min für 94°C; 30 Zyklen je 30 s bei 94°C, 30 s bei 56,5°C, 1 min bei 72°C; 5 min bei 72°C				
<i>chuA</i>	f TGCCGCCAGTACCAAAGACA r TTCAGCATTACTGTATGGCAGTG p GGAGATCACTCCACCCAGCG	121	CP002797.2	(Clermont <i>et al.</i> 2000) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
<i>yjaA</i>	f CTGCCTTCAGTAACCAGCG r AAAGAATGCCAGGTTGAACG p GCAAGATCTTGTCTGCAACTC	106	CP002797.2	(Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
TSPE4C2	f GAGTAATGTCGGGGCATTCA r GAGACAGAAACGCGGGTAGA p CAAGTTCGATAGTCTGAATA	90	CP002212	(Clermont <i>et al.</i> 2000) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b) (Frömmel <i>et al.</i> 2013b)
Einzel-PCR zum Nachweis des pEAF-Plasmids in EPECs nach Franke et al. 1994				
pEAF	f CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA r TATGGGGACCATGTATTATCA	397	X76137.1	(Franke <i>et al.</i> 1994) (Franke <i>et al.</i> 1994)

3.3 Zelllinien

Tab. 7: Zelllinien, deren Ursprung, Gewebeart und Anwendung innerhalb dieser Arbeit.

Zelllinie	Ursprungsorganismus	Gewebe	Anwendung
Caco-2	Mensch	Colonepithel (Dickdarm)	Adhäsionsassay
LoVo	Mensch	Colonepithel (Dickdarm)	Zytotoxizitätsassay
5637	Mensch	Harnblasenepithel	Adhäsions- und Zytotoxizitätsassay
HEp-2	Mensch	Kehlkopfepithel	EPEC und DAEC Adhäsionsassay
IPEC-J2	Schwein	Jejunumepithel (Dünndarm)	Adhäsions- und Zytotoxizitätsassay
PK-15	Schwein	Nierenepithel	Adhäsions- und Zytotoxizitätsassay

3.4 Lösungen und Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die in Tab. 8 aufgelisteten Standardpuffer und Lösungen mit ddH₂O hergestellt. PCR-Puffer, PBS und die Stammlösungen wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert. Für die Kultivierung der Zelllinien wurden dem Zellkulturmedium Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) zugegeben. Für die Durchführung der Adhäsions- und Zytotoxizitätsassays wurde antibiotikafreies Medium verwendet, welches ansonsten der in Tab. 9 aufgelisteten Zusammensetzung entsprach. Sämtliche Medien für die Zellkultur wurden von der Firma Biochrom (Deutschland) bezogen. Nähr- und Selektivmedien für die Bakterienkulturen sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 8: Standardpuffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10xPCR-Puffer	160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670 mM Tris-HCL (pH 8,8 bei 25°C), 0,1% Tween 20
10xPCR-Puffer mit Mg ²⁺	10xPCR-Puffer, 34 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O
1xPBS	1 g/L (7 mM) NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O, 7,6 g/L (46 mM) Na ₂ HPO ₄ , 9 g/L (154 mM) NaCl, pH 7,5
1xPBS-Tween	0,02% Tween 20 in 1xPBS
1xTBE	10,8 g/L Tris, 5,5 g/L Borsäure, 0,75 g/L EDTA, pH 7,0
DAPI-Lösung	50 µg/mL
EDC-Lösung	122,5 mg/mL in Methylimidazol-Lösung
EDTA-Stammlösung	0,5 M, pH 8,0
Kollagenlösung	2 M Essigsäure, 50 µg/µL Kollagen
Ladepuffer	50% Glycerin, 100 mM EDTA, 1 mM TRIS-HCL, 0,025% Bromphenolblau
Methylimidazolösung	0,1 M Methylimidazol, pH 7,0
Paraformaldehydlösung	4%
Propidiumiodidlösung	10 µg/mL
TRIS-HCL-Stammlösung	10 mM, pH 8,0

Tab. 9: Zellkulturmedien.

Zelllinie	Medium 500mL-Flasche	Fetal Bovine Serum (FBS)	L-Glutamin (200mM)	Penicillin/ Streptomycin	Na-Pyruvat
Caco-2, LoVo	DMEM/Ham's F12 1:1	final 10%	final 2mM	1%	---
PK-15, IPEC-J2, HEp-2	DMEM/Ham's F12 1:1	final 5%	final 2mM	1%	---
5637	RPMI 1640	final 10%	final 2mM	1%	1mM

Tab. 10: Nähr- und Selektivmedien für Bakterienkulturen.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt, pH 7,5
CHROMagar™ Orientation	33 g/L CHROM Agar Orientation als Fertigpulver (Mast Diagnostics, UK)
Gassneragar	47,7 g/L Wasserblau-Metachromgelb-Agar als Fertigpulver (Sifin, Deutschland)
Blutagar	gebrauchsfertige Agarplatten (Biomerieux, Deutschland)
API 20 E®	Biomerieux, Deutschland

3.5 Enzyme, Farbstoffe, Größenmarker, Chemikalien

Tab. 11: Enzyme, Farbstoffe, Größenmarker, Chemikalien.

Enzyme	Bezugsquelle
BioTherm™ DNA-Polymerase	Rapidozym GmbH, Deutschland
(10x) Trypsin (1:250)/EDTA-Lösung (0,5%/0,2%)	Biochrom AG, Deutschland
Farbstoffe	Bezugsquelle
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem GmbH, Deutschland
Propidiumiodid	AppliChem GmbH, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Größenmarker	Bezugsquelle
50 bp-DNA-Leiter (ready to use)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
20 bp-DNA-Leiter (ready to use)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Chemikalien	Bezugsquelle
(NH ₄) ₂ SO ₄	AppliChem GmbH, Deutschland
10x BioTherm Puffer ohne MgCl ₂	Rapidozym GmbH, Deutschland
1-Methylimidazol	Sigma Aldrich, Deutschland
Agarose NEEO Ultra-Qualität ROTI®GAROSE	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Borsäure	AppliChem GmbH, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
dNTP Mix: 10 mM dATP, dCTP, dGTP, 20 mM dUTP	Jena Bioscience, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland

Chemikalien	Fortsetzung	Bezugsquelle
Essigsäure		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Ethidiumbromid		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
FBS (500ml) Standard		PAA, Deutschland
Hefeextrakt		AppliChem GmbH, Deutschland
Heringsperma-DNA		Sigma Aldrich, Deutschland
Isopropanol		VWR, Deutschland
Kollagen		Becton, Dickinson und Company, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)		Biochrom AG, Deutschland
MgCl ₂ (50 mM)		Rapidozym GmbH, Deutschland
MgCl ₂ ·6H ₂ O		AppliChem GmbH, Deutschland
Mineralöl für die Mikrobiologie		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
EDC		Sigma Aldrich, Deutschland
Na ₂ HPO ₄		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Na-Pyruvat (100 mM)		Biochrom AG, Deutschland
Natriumchlorid		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Paraformaldehyd		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml, 10.000 µg/ml		Biochrom AG, Deutschland
Poly-L-Lysin-Hydrobromid MW 30.000-70.000		Sigma Aldrich, Deutschland
Tris-HCl		AppliChem GmbH, Deutschland
Triton X-100		AppliChem GmbH, Deutschland
Tween 20		Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Trypton		AppliChem GmbH, Deutschland

3.6 Verbrauchsmaterial und Kits

Tab. 12: Verbrauchsmaterial und Kits.

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Cryo 1°C Freezing Container "Mr. Frosty"	Nalgene Labware, Deutschland
96-Well-Platten Nunclon™ Δ Surface	Nunc A/S, Dänemark
NucleoLink™ Strips	Nunc A/S, Dänemark
Zellkulturflaschen (25 cm ² / 75 cm ² / 175cm ²)	TPP, Schweiz
serologische Pipetten	Biochrom AG, Deutschland
Falcon-Tubes (15mL/ 50mL)	Biochrom AG, Deutschland
Einmalküvetten	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
1,5 mL Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
PCR-Gefäße	Brand, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co, Deutschland
Pipettenspitzen für Zellkultur	nerbe plus GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen für PCR	Ratiolab, Deutschland
Objektträger (Menzel-Gläser)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Kits	Bezugsquelle
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Deutschland
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Deutschland

3.7 Geräte

Tab. 13: Geräte für allgemeine Laborarbeit und für die Mikroskopie.

Gerät	Bezugsquelle
Analysewaage LE 5201	Atilon Satorius, Deutschland
Feinwaage	Atilon Satorius, Deutschland
Geldokumentationssystem BioDoc Analyzer	Biometra, Deutschland

Gerät	Fortsetzung	Bezugsquelle
BioPhotometer plus		Eppendorf, Deutschland
Electrophoresis Power supply MP-300V		Major Science, USA
Inkubator (Zellkulturen)		Binder, Deutschland
Inkubator UFB 500 (Bakterienkulturen)		Memmert, Deutschland
Mastercycler eppgradient		Eppendorf, Deutschland
Minitron Rührgerät		Infors AG, Schweiz
NanoDrop ND1000 Spektrophotometer		NanoDrop, Thermo Scientific, Deutschland
Pipetten, Mehrkanalpipetten		Eppendorf, Deutschland
Seven Easy pH-Meter		Mettler Toledo, Schweiz
Thermomixer comfort		Eppendorf, Deutschland
Vortex Genius 3		IKA®, Deutschland
Vakuumpumpe BVC 21 NT		Vacuubrand, Deutschland
Wasserbad TW12		Julabo Labortechnik GmbH, Deutschland
Biofuge fresco 17 Rotor 75003424		Heraeus, Deutschland
Biofuge fresco Rotor #3328		Heraeus, Deutschland
Centrifuge 5804R Rotor A-2-DWP		Eppendorf, Deutschland
MiniSpin plus Rotor F-45-12-11		Eppendorf, Deutschland
Multifuge 1 S-R Rotor 75002000		Heraeus, Deutschland
Multifuge 1 S-R Rotor F-55-16-5-PCR		Heraeus, Deutschland
Mikroskopiekomponenten		Bezugsquelle
Fluoreszenzmikroskop IX-81		Olympus Corporation, Japan
Kamera: Kappa DX2HC (mit Sony ICX285AL CCD-Chip)		KAPPA opto-electronics GmbH, Deutschland
Kamera: Kappa DX2H (mit Sony ICX285AL CCD-Chip)		KAPPA opto-electronics GmbH, Deutschland
Kamera: Kappa DX4C-285 (mit Sony ICX285AL CCD-Chip)		KAPPA opto-electronics GmbH, Deutschland
Kamera: Kappa PS4C-285 (mit Sony ICX285AL CCD-Chip)		KAPPA opto-electronics GmbH, Deutschland
Scan Stage IM 120x100		Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.KG, Deutschland
PrecisExcite LED 400nm und 490nm		CoolLED, UK
DA/FI-A Filtersatz		Semrock, USA
Xenonlampe (75W)		Olympus Corporation, Japan
Halogenlampe (12 V, 100 W)		Olympus Corporation, Japan
Durchlichtbeleuchtungssäule IX2-III 100		Olympus Corporation, Japan
Kondensator, motorisiert, IX2-LWUCDA2		Olympus Corporation, Japan
10x-Objektiv: UPlanFLN/10x/0.30 Ph1/∞/-/FN26.5		Olympus Corporation, Japan
20x-Objektiv: LUCPlanFLN/20x/0.45 Ph1/∞/0-2/FN22		Olympus Corporation, Japan
60x-Objektiv: LCPlanFI/60x/0.7 Ph2		Olympus Corporation, Japan

4. Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Anzucht und Isolierung von *Escherichia coli*

Von achtzehn verschiedenen Wildtierarten wurden in der Lausitz in den Jahren 2007 bis 2011 mit sterilen Wattestäbchen Kotproben aus dem Rektum (Säugetiere) bzw. aus der Kloake (Vögel) entnommen. Die Wildtiere waren vorwiegend Unfallopfer, deren Verwesungsprozess noch nicht begonnen hatte. Weitere Bezugsquellen sind in Tab. 3 angegeben. Die Isolate wurden in der Stammsammlung von Prof. Peter Schierack konserviert.

Zur Identifikation der Isolate als *E. coli* wurden die Proben auf CHROMagar-Orientierungsplatten ausgestrichen (Merlino *et al.* 1996). Nach Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37°C erfolgte die farbliche Differenzierung von *E. coli* (pink) anhand der Umwandlung verschiedener im Agar enthaltener chromogener Substanzen durch spezifische Enzyme von *E. coli*. Pink gefärbte Kolonien wurden auf Gassner-Agar, ein Metachromgelb enthaltendes Selektivmedium für gramnegative Bakterien, übertragen. Die Bestätigung von *E. coli* erfolgte, wenn pink gefärbte Kolonien auf Gassner-Agar Laktose verwerten konnten, was durch einen Farbumschlag der Kolonien nach blau/grün ersichtlich wurde (Ewers *et al.* 2009b; Guenther *et al.* 2009; Schierack *et al.* 2009; Frömmel *et al.* 2013b). Eine Kolonie pro Probe wurde daraufhin zweimal auf CHROMagar-Orientierung subkultiviert, um eine Reinkultur zu erhalten. Die exakte Klassifizierung von sieben Isolaten, welche weder mittels Selektivagar noch mittels PCR-Analysen (Abs. 4.3.3) eindeutig als *E. coli* identifiziert werden konnten, erfolgte zusätzlich mittels API 20 E® Test. Die Hämolyse durch *E. coli*-Isolate wurde auf Blutagarplatten (LB-Agar versetzt mit 5% Schafblut) ermittelt. Die Isolate wurden auf diesem Agar fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Befähigung von Isolaten zur Hämolyse wurde durch die Bildung einer transparenten Zone um die jeweilige Bakterienkolonie ersichtlich.

4.1.2 Konservierung und Kultivierung der *Escherichia coli*-Isolate

Zur Cryokonservierung der *E. coli*-Isolate wurde eine Kolonie einer auf CHROMagar-Orientierung über Nacht gewachsenen Subkultur in 700 µL LB-Medium überimpft und bei 180 rpm und 37°C für 5-8 h inkubiert. Von der Bakterienkultur wurden 600 µL entnommen und mit 150 µL 80% Glycerin vermischt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Anzucht der Bakterien im Flüssigmedium wurden diese aus der -80°C-Cryokultur auf CHROMagar-Orientierungsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeweils eine Kolonie wurde in 1 mL LB-Medium überimpft und bei 180 rpm und 37°C über Nacht angezogen.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung von DNA

4.2.1.1 Lyse von *Escherichia coli* zur Gewinnung von Gesamt-DNA

Eine Bakterienkolonie des entsprechenden Isolates wurde in 1 mL LB-Medium bei 180 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 8.000 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 300 µL ddH₂O resuspendiert und für 10 min bei 99°C inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Abkühlung der Lösung für 15 min auf Eis. Anschließend wurde 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert, um Proteine und Zellbruchstücke von der DNA zu trennen. Der Überstand wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Lysate enthielten ca. 230 ng DNA/µL.

4.2.1.2 Isolierung bakterieller DNA

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 mL LB-Medium bei 180 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Aus dem Bakterienpellet wurde die chromosomale DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit entsprechend des dazugehörigen Protokolls isoliert. Plasmide wurden mit dem Qiagen Plasmid Mini oder Midi Kit entsprechend der dazugehörigen Protokolle isoliert. Die Elution der DNA erfolgte in 20 bzw. 50 µL ddH₂O.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Quantifizierung der DNA-Konzentrationen erfolgte mittels NanoDrop ND1000 Spectrophotometer. Die DNA-Konzentration einer Lösung (ng/µL) wurde durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm bestimmt.

4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion und Agarosegelelektrophorese

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte eingesetzt. Die Annealingtemperatur wurde der DNA-Sequenz der Primer entsprechend angepasst. Die Elongationszeit variierte je nach Länge des zu erwartenden PCR-Produktes. Es wurde dafür eine Synthesegeschwindigkeit der BioThermTMDNA-Polymerase von 1.000 bp/min angenommen. PCR-Programme sind in Tab. 6, Reaktionsansätze in Tab. 14 aufgelistet.

Die Detektion der Amplifikate erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (AGE), mit der es möglich ist, geladene Moleküle in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Größe und dreidimensionalen Struktur zu trennen. Die Agarosekonzentration der Gele betrug zwischen 1% und 3% entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente.

4.3 Arbeiten mit Mikropartikeln

4.3.1 Kopplung von Oligonukleotidsonden an Mikropartikel mit Methylimidazol

Genspezifische Oligonukleotidsonden wurden jeweils an definierte Mikropartikelpopulationen gekoppelt. Die Kopplung erfolgte in 0,2 mL Tubes, die vor der Reaktion mit 250 μ L 0,02% PBS-Tween gewaschen wurden. 50 μ L frisch hergestellter 0,1 M Methylimidazol (MI)-Puffer (pH 7,0) wurde in die gewaschenen Tubes vorgelegt. Die in ddH₂O bei 4°C gelagerten Mikropartikel wurden hinzugegeben (250.000 Stück) und für 3 min bei 3.700 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 100 μ L MI-Puffer und 250 pmol der entsprechenden Oligonukleotidsonde erfolgte die Zugabe von 25 μ L einer frisch hergestellten 122,5 mg/mL EDC-Lösung (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid) in 0,1 M MI (pH 7,0). Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch gevortext und bei 50°C für mindestens 2 h bei 1.000 rpm im Thermoschüttler unter Lichtabschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Tubes zweimal für 3 min bei 3.700 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 μ L 0,02% PBS-Tween durch starkes Vortexen resuspendiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die mit Oligonukleotidsonden beladenen Mikropartikel in 50 μ L 0,02% PBS-Tween durch starkes Vortexen resuspendiert und die jeweils getrennt gekoppelten Mikropartikelpopulationen einer Multiplex-PCR (mPCR) (Tab. 6) in Eppendorf-Tubes zusammengeführt und bei 4°C gelagert (Frömmel *et al.* 2013b).

4.3.2 Immobilisierung von Mikropartikeln

Mit Oligonukleotidsonden gekoppelte Mikropartikel wurden vor der Durchführung von mPCRs am Boden von 96-Well-NucleoLink® Messplatten immobilisiert (Frömmel *et al.* 2011; Rödiger *et al.* 2012b). Als Crosslinker zwischen Mikropartikeln und Plastikwellboden wurde die Aminosäure L-Lysin (PLL) eingesetzt (Huang *et al.* 1983; Taylor *et al.* 2003). NucleoLink®-Wells wurden mit 40 μ L einer PLL-Lösung von 14 ng/mL in 1xPBS für 2 h bei 40°C inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Wells mit 100 μ L 1xPBS für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit 40 μ L 1xPBS und der Suspension der mit Oligonukleotidsonden gekoppelten Mikropartikel gefüllt. Die Wells wurden unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur getrocknet (Frömmel *et al.* 2011).

4.3.3 Mikropartikelbasierte Multiplex-PCR

Zur Vorbereitung auf die mPCRs wurden die immobilisierten Mikropartikel zweimal mit 100 μ L ddH₂O, daraufhin einmal mit 1xPCR-Puffer ohne MgCl₂ und abschließend mit 1xPCR-Puffer mit MgCl₂ gewaschen. Nach der Umpufferung wurde der PCR-Mastermix (Reaktionsansätze in Tab. 14) in die Wells pipettiert, das Lysat hinzugegeben und mit 20 μ L Mineralöl überschichtet. Die mPCRs (Tab. 6) erfolgten im Mastercycler epgradient. Während der PCR-Reaktion erfolgte die Markierung des zur

Oligonukleotidsonde komplementären DNA-Stranges mittels des entsprechenden CyTM5-fluoreszenzmarkierten Primers. Im Anschluss an die PCR hybridisierte der markierte DNA-Strang an die entsprechende Oligonukleotidsonde am Mikropartikel.

Tab. 14: Reaktionsansätze für Standard-Einzel-PCRs und die mPCRs des MPMA.

Reaktionsansätze	Standard-Einzel-PCR	exVAGs	
		mPCR 1 bis 5, mPCR 8 (ECOR)	inVAGs mPCR 6 und 7
Hitzelysat (Template-DNA)	50 ng	3 µL	3 µL
10 x Puffer	2 µL	2 µl	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2 µL	2 µl	2 µl
dNTP-Mix+dUTP (je 2 mM)	2 µL	2 µl	2 µl
Primer vorwärts (100 pmol)	10 pmol	jeweils 10 pmol	jeweils 10 pmol
Primer rückwärts (100 pmol)	10 pmol	jeweils 10 pmol	jeweils 10 pmol
ddH ₂ O	x µL	x µl	x µl
BioTherm TM DNA-Polymerase	1 U	1 U	2 U
Gesamt	20 µL	20 µL	20 µL

Die mPCRs wurden im 96-Well-Plattenformat durchgeführt. Auf jeder 96-Well-Platte wurden acht Negativkontrollen (6 x Heringsperma-DNA und 2 x ddH₂O) sowie acht Kavitäten für Positivkontrollen (Tab. 5) mitgeführt. Zusätzlich enthielt jede Kavität zwei Mikropartikelpopulationen (a und b) als *intra*-Well-Negativkontrollen. An diese wurde a) keine Oligonukleotidsonde und b) eine unspezifische Oligonukleotidsonde (für das humane Protein SERCA2, DNA-Sequenz: 5'-Aminohexyl + 10T + GTCACCTCCACTTCTGATCC) gekoppelt. Pro 96-Well-Platte konnten 80 verschiedene *E. coli*-Stämme mit einer mPCR untersucht werden.

4.3.4 Auswertung des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays

Da aufgrund unterschiedlicher GC-Gehalte, differierender Länge und Sekundärstrukturbildung der Oligonukleotidsonden und Amplifikate die Hybridisierungseffizienz und somit die resultierende Fluoreszenzintensität für jedes Gen unterschiedlich war, musste für jedes Gen und für jede PCR der Schwellwert zur Definition von positiv und negativ ermittelt werden.

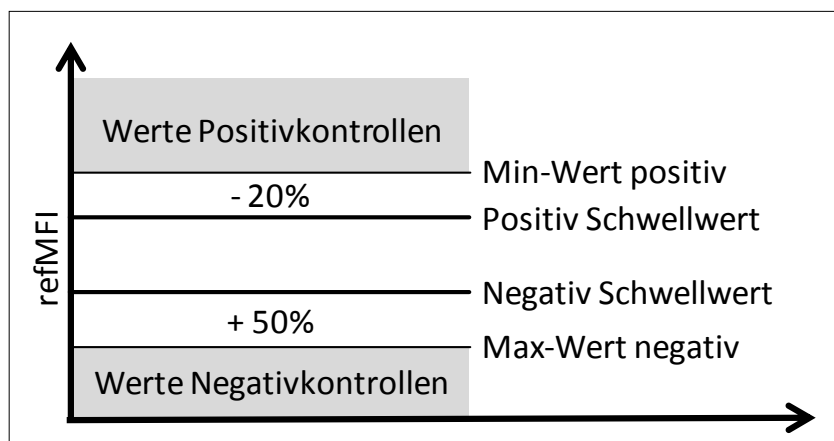


Abb. 1: Schema für die Ermittlung der Schwellwerte des MPMA.

Für jedes Gen standen nach der Durchführung des gesamten Screenings sowohl die Daten der 398 untersuchten *E. coli*-Isolate als auch der Negativ- und Positivkontrollen von fünf 96-Well-Platten der acht mPCRs in Doppelbestimmung (z.T. auch Dreifachbestimmung) zur Verfügung. Zur Etablierung des Auswertungsverfahrens wurde die vergleichende Analyse mittels AGE durchgeführt. Die Bewertung erfolgte nach dem in Abb. 1 aufgezeichneten Schema. Der Negativ-Schwellwert beschreibt den um 50% erhöhten höchsten Wert der gesamten *intra*- und *inter*-Well-Negativkontrollen für das untersuchte Gen auf einer 96-Well-Platte (Max-Wert negativ). Der Positiv-Schwellwert beschreibt den um 20% abgesenkten niedrigsten Wert aller Positivkontrollen pro Gen auf einer 96-Well-Platte (Min-Wert positiv). Werte zwischen Positiv- und Negativ-Schwellwert (fragwürdige Ergebnisse) wurden im Anschluss noch einmal mittels AGE bzw. Einzel-PCRs verifiziert.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in 25 bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 37°C kultiviert und zweimal pro Woche subkultiviert. Nach Entfernen des verbrauchten Zellkulturmediums und einem Waschschrift mit 1xPBS wurden 1 bis 2 mL einer Trypsin/EDTA-Lösung (10 mg/mL) zugegeben, um während der etwa fünf- bis fünfzehnminütigen Inkubation bei 37°C die Zell-Matrix-Verbindung aufzubrechen. Die somit vom Boden der Zellkulturflasche abgelösten Zellen wurden nach Zugabe von 10 mL frischem Zellkulturmedium der Zellkulturflasche entnommen und in ein 15 mL Falcon überführt. Zur Ermittlung der Zellanzahl (Abs. 4.4.3) wurde 1 mL der Suspension entnommen. Die verbliebene Suspension wurde bei 1.000 rpm für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium in einer Konzentration entsprechend der weiteren Verwendung resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen oder auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät.

4.4.2 Konservieren und Auftauen von Zellen

Die Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff konserviert. In Vorbereitung der Cryokonservierung erfolgte die Kultivierung der Zellen in 150 cm² Zellkulturflaschen. Nach Trypsinieren und Waschen (Abs. 4.4.1) der Zellen wurden diese in 10 mL Zellkulturmedium mit 20% Serum und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) suspendiert und je 1 mL in Cryotubes überführt. Um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Cryotubes für eine Woche in einem Freezing Container „Mr. Frosty“ bei -80°C aufbewahrt, um sie danach in flüssigen Stickstoff umzulagern.

Zur Reaktivierung der Zellen wurden diese direkt nach der Entnahme aus flüssigem Stickstoff im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 6 mL

37°C warmen Zellkulturmedium ausgesät. Nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen (Abs. 4.4.1) erfolgte ein Mediumwechsel zur Entfernung des DMSO und abgestorbener Zellen.

4.4.3 Zellanzahlbestimmung

Die nach der Trypsinierung (Abs. 4.4.1) entnommene Zellsuspension (1 mL) wurde nach Zentrifugation mit 1xPBS gewaschen und mit 9 mL 1xPBS versetzt. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde 1:10 mit Trypanblau versetzt und mittels Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Anzahl der lebenden, nicht gefärbten Zellen von vier Großquadraten wurde gemittelt und mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen) und dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert, um die Anzahl der Zellen pro mL zu ermitteln.

4.4.4 Adhäsionsassay

Adhäsionsassays wurden in Anlehnung an Schierack *et al.* 2011 durchgeführt (Schierack *et al.* 2011). Die Zellen der Zelllinien Caco-2, IPEC-J2, 5637 und PK-15 wurden in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers unter Standardbedingungen (Abs. 4.4.1) inkubiert. Unmittelbar vor der Inokulation mit Bakterien wurde das Zellkulturmedium vorsichtig entfernt, der Zellmonolayer einmal mit 1xPBS gewaschen und mit 100 mL antibiotikafreiem frischen Zellkulturmedium überschichtet.

Die zu untersuchenden *E. coli*-Isolate wurden über Nacht in 1 mL LB-Medium bis zu einer OD_{600} zwischen 0,8 und 1,2 vermehrt, was einer Konzentration von 3×10^8 Bakterien/mL/ OD_{600} entspricht. Die Zellmonolayer wurden mit einer Infektionsrate von 62.500 Bakterien/ mm^2 inokuliert. Basierend auf der Anzahl der IPEC-J2-Zellen pro Well erfolgten die Berechnungen der Multiplizität der Infektion (MOI) von 100:1 Bakterium pro Zelle (Tab. 16). Die MOI wurde in antibiotikafreiem Zellkulturmedium eingestellt. Jeweils bereits vorbereitete Zellkulturplatten wurden nun mit 50 μ L der Bakteriensuspension versetzt und unter Standardbedingungen (Abs. 4.4.1) 4 h inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit 1xPBS zur Entfernung nichtadhärenter *E. coli*. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 4% PFA in ddH₂O und Lagerung bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung, jedoch mindestens über Nacht. Nach der Fixierung wurden die Wells vorsichtig dreimal mit 1xPBS gewaschen und mit Propidiumiodid (50 μ L einer Lösung von 10 μ g/mL in ddH₂O) für 15 min gefärbt. Nach drei weiteren Waschschrten mit 1xPBS wurden die Zellen zur Messung mit 100 μ L 1xPBS überschichtet (Frömmel *et al.* 2013b).

Alle Ansätze wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Pro Platte wurden 27 Isolate untersucht. Auf den Zellkulturplatten wurden jeweils sechs Kavitäten ohne Bakterien zur Bestimmung des Leerwertes und jeweils drei Stämme als Adhäsionskontrolle

mitgeführt (Tab. 4). Die Detektion erfolgte wie in Abs. 4.5.2.6 beschrieben. Die Einstufung der Adhäsionsfähigkeit wurde in Abhängigkeit der Anzahl adhärenter Bakterien/mm² vorgenommen (Tab. 15). Wurden weniger als 1.000 Bakterien/mm², d.h. dem Leerwert entsprechende Messwerte, detektiert, galt dies als nicht adhärent.

Tab. 15: Einstufung der Adhäsionsrate in Abhängigkeit der Anzahl adhärenter Bakterien pro mm².

Anzahl adhärenter <i>E. coli</i> pro mm ²	Einstufung der Adhäsionsrate	
< 1.000	nicht adhärent	(-)
1.000 bis 4.999	schwach adhärent	(+)
5.000 bis 9.999	mittel adhärent	(++)
> 10.000	stark adhärent	(+++)

4.4.5 EPEC-Adhäsionsassay

Um die Mikrokoloniebildung der EPEC zu prüfen, wurden Adhäsionsassays mit *eaeA*⁺ Isolaten mit einer Gesamtinkubationszeit von 6 h auf den Zelllinien IPEC-J2, 5637, PK-15 und HEp-2 entsprechend Abs. 4.4.4 durchgeführt. Nach 3 h Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Detektion erfolgte entsprechend Abs. 4.5.2.7.

4.4.6 Zytotoxizitätsassay

Dieser Assay diente zur Ermittlung der Zytotoxizität hämolytischer *E. coli* auf den Zelllinien LoVo, IPEC-J2, 5637 und PK-15. Die Durchführung erfolgte entsprechend Abs. 4.4.4. Gemessen wurde jedoch jeweils zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Abstand von zwei Stunden (LoVo: 3 und 5 h; 5637, IPEC-J2, PK-15: jeweils 4 und 6 h Inkubation). Zusätzlich erfolgte eine Färbung mit DAPI (50 µL einer Lösung von 50 µg/mL in ddH₂O) für 30 Sekunden, gefolgt von drei weiteren Waschschrritten mit 1xPBS. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und dreimal wiederholt. Die Detektion erfolgte wie in Abs. 4.5.3.2 beschrieben. Acht Kavitäten pro 96-Well-Platte wurden ohne Bakterien inkubiert (Leerwert). Der Mittelwert der resultierenden Messwerte diente als Referenzwert zur Berechnung der prozentualen Werte der einzelnen Isolate pro 96-Well-Platte. Ausgewertet wurde die zum Leerwert referenzierte zerstörte Fläche des Monolayers. Ein Wert von 50% bedeutet demnach, dass die Hälfte des Monolayers im Vergleich zum Leerwert durch die Bakterien zerstört wurde.

4.5 Mikroskopische Methoden

4.5.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie ist ein optisches Kontrastverfahren, bei dem Unterschiede in der Dichte von Strukturen dargestellt werden. Dabei werden Objekte mit höherer Dichte dunkler als Objekte mit geringerer Dichte abgebildet. Für Phasenkontrastaufnahmen wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX81) mit einer Durchlichtbeleuchtungssäule (Olympus IX2-III 100) und

motorisiertem Kondensator mit Phasenringblende (Olympus IX2-LWUCDA2) verwendet. Als Lichtquelle diente eine Halogenlampe (12 V, 100 W). Genutzte Objektive sind in Tab. 13 aufgelistet.

4.5.2 VideoScan-Fluoreszenzmikroskopie

4.5.2.1 Fluoreszenz-Imaging-Technologie

VideoScan ist eine an der Hochschule Lausitz in Kooperation mit Industriepartnern entwickelte und 2008 patentierte (Lehmann *et al.* 2008) universelle Technologieplattform zur automatisierten hochselektiven, bildbasierten Multifluoreszenzdetektion. Das fluoreszenzoptische bildgebende Messsystem besteht aus der Steuer- und Auswertesoftware *FastFluoScan* und kommerziell verfügbaren Hardwarekomponenten. Die Software verfügt über eine Hardwareabstraktionsschicht und kann mit Geräten verschiedener Hersteller zusammenarbeiten. Die Komponenten des Systems sind ein handelsübliches, motorisiertes, inverses Fluoreszenzmikroskop mit mindestens drei Fluoreszenzkanälen, ein motorisierter Kreuztisch sowie eine digitale Graustufenkamera. An der Hochschule Lausitz wurden für die Messungen ein Olympus IX81-Mikroskop mit einer Xenon- oder LED-Lampe als Lichtquelle und der Objektträgtisch ScanStage IM 120x100 der Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co KG eingesetzt. Die verwendeten Kameras DX2HC, DX2H, DX4C-285 und PS4C-285 waren mit dem CCD-chip Sony ICX285AL ausgestattet (Tab. 13). Die Auswertungssoftware erlaubte durch ihr modulares Design die Adaption an unterschiedliche Fragestellungen. Die Messungen wurden durch die Software vollautomatisch gesteuert, wodurch keine Nutzerinteraktionen erforderlich waren (Rödiger *et al.* 2012b).

4.5.2.2 Analyse fluoreszenzkodierter Mikropartikel

Eine Anwendung der VideoScan-Technologie bestand in der Erfassung und Analyse fluoreszenzkodierter Mikropartikel. Die eingesetzten 6 bis 20 μm großen thermotoleranten, auf der Oberfläche carboxylierten Mikropartikel aus Polymethylmethacrylat waren durch ein spezifisches Mischungsverhältnis von zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Farbe 1: Anregung 420-480 nm / Emission 485-540 nm, Farbe 2: Anregung 515-540 nm / Emission 535-570 nm) definiert (PolyAn GmbH, Deutschland), wodurch eine Abgrenzung unterschiedlicher Mikropartikelpopulationen und demnach multiparametrische Messungen ermöglicht wurden (Abb. 2). Zur Messung befanden sich die Mikropartikel auf dem Boden einer transparenten Mikrotiterplatte. Die Messung wurde mit einem Objektiv mit 10-facher Vergrößerung durchgeführt. Nach einer automatischen Positionierung der Kavität erfolgte die automatische Fokussierung auf die Mikropartikel in der Mitte der Kavität. Mit zwei Fluoreszenzkanälen wurden die Kodierungsfarbstoffe erfasst (Kodierungskanäle). Mittels digitaler Bildverarbeitung wurden die Mikropartikelpopulationen anhand des dekadisch logarithmierten Verhältnisses der Sig-

nalintensitäten jedes einzeln liegenden Mikropartikels einer so genannten Populationsidentifikationszahl (PopID) zugeordnet. Anhand dieser PopID und der ermittelten Größe konnte jedes Mikropartikel seiner Population zugeordnet werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Zuordnung zu einer falschen Population betrug bei diesem Verfahren deutlich weniger als 1%. Die Software war in der Lage, Artefakte, wie agglomerierte Mikropartikel, Verunreinigungen oder Luftblasen automatisch zu erkennen und ohne Einfluss auf die Messung auszuschließen (Rödiger *et al.* 2012b; Frömmel *et al.* 2013b).

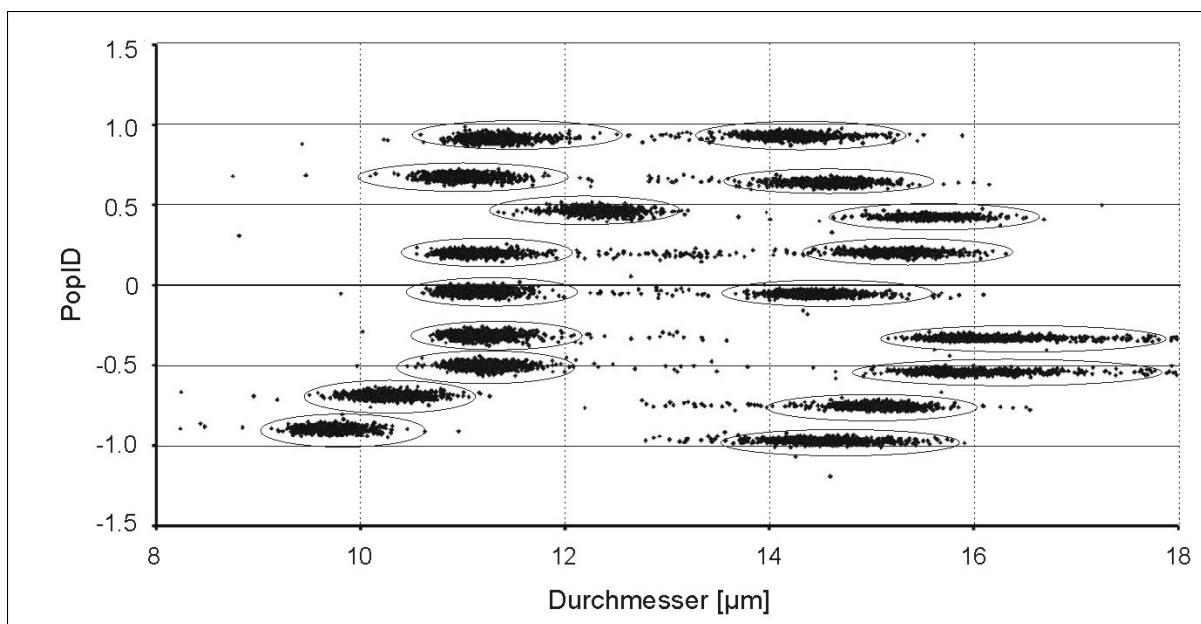


Abb. 2: Klassifizierung von 18 Mikropartikelpopulationen anhand des Durchmessers der Mikropartikel und des Verhältnisses der Signalintensitäten der beiden Kodierfarbstoffe (PopID).

4.5.2.3 Detektion der Amplikate des MPMA

Nach erfolgreicher Hybridisierung eines CyTM5-markierten DNA-Stranges an dessen komplementäre Oligonukleotidsonde (Abs. 4.3) befand sich nun an der Oberfläche der entsprechenden Mikropartikel mit dem markierten Amplikat ein dritter Fluoreszenzfarbstoff, welcher durch eine ringförmige Fluoreszenz detektierbar und quantifizierbar wurde. Um Messungen auf unterschiedlichen Geräten oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander vergleichen zu können, wurde die Intensität der absoluten Ringfluoreszenz zu den Fluoreszenzintensitäten der beiden Kodierfarbstoffe ins Verhältnis gesetzt und somit die referenzierte mittlere Fluoreszenzintensität (refMFI) berechnet. Die Referenzierung der Ringfluoreszenz auf ein Mikropartikelkodierungssignal kompensierte unterschiedliche Beleuchtungsintensitäten und Gerätedrifts vollständig. Eine validierte Aussage über die Messergebnisse war mit der Mindestanzahl an Mikropartikeln von n=20 möglich. Die Belichtungszeit zur Detektion des Ligandensignals konnte so gewählt werden, dass auch extrem schwache Signale präzise gemessen werden konnten. Die Software passte die Belichtungszeit für die Messung

der Ligandenfluoreszenz für jedes Mikropartikel dynamisch an. Dabei wurde ein großer Dynamikbereich von 100 dB (1:100.000) erreicht. Die VideoScan-Technologie hat zudem den Vorteil, dass durch die hardware- und zeitpunktunabhängige Vergleichbarkeit der Messung und das Vorhandensein der Mikropartikel in der Mikrotiterplatte Mehrfachmessungen, z.B. für die Messung von Kinetiken, möglich sind (Rödiger *et al.* 2012b; Frömmel *et al.* 2013b).

4.5.2.4 Analyse von Epithelzellen

Eine weitere Anwendung der VideoScan-Technologie bestand in der Erfassung und Analyse fluoreszenzgefärbter eukaryotischer Zellen. Die in 96-Well-Platten kultivierten, mit PI gefärbten konfluenten Monolayer wurden nach der automatischen Positionierung der Kavität mit 20-facher Vergrößerung fokussiert, um Bilder aufzunehmen. Für diese Messung war nur ein Fluoreszenzfilter (Ex: 532-557nm, Em: 570-640nm) nötig. Jedes Bild wurde in 108 quadratische Bereiche (12x9) mit jeweils 37 μm Seitenlänge unterteilt. Ein Bereich galt als überbelichtet, wenn dessen Helligkeit, d.h. der mittlere Grauwert des Feldes, über einem Schwellwert lag. In diesen Bereichen lag eine hohe unspezifische Hintergrundfärbung vor, die aus inhomogenem dreidimensionalen Zellwachstum bzw. einer begrenzten Tiefenschärfe des Objektivs (5 μm) resultierte. Lag der numerische Wert der Tiefenschärfe eines Feldes unterhalb einer definierten Schwelle, wurden die Felder als unscharf definiert. Defekte Monolayer wurden durch die Schärfe definiert. Der Schwellwert für die Schärfe wurde einmal empirisch für jede Zelllinie bestimmt und blieb bei allen Messungen konstant. Überbelichtete, leere oder unscharfe Bildbereiche bzw. Bereiche ohne Zellmonolayer sowie daran angrenzende Bereiche wurden von der weiteren Bearbeitung automatisch ausgeschlossen (Frömmel *et al.* 2013b).

4.5.2.5 Bestimmung der Anzahl von Epithelzellen pro Fläche

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Anzahl der Zellen pro mm^2 , bzw. pro Kavität ermittelt. Konfluente Zellmonolayer wurden nach der Fixierung mit DAPI fluoreszenzgefärbt (Abs. 4.4.6). Von jeder Kavität erfolgte eine Aufnahme mit dem 10x-Objektiv, womit eine Bildgröße von 899,6 x 670,8 μm (0,603 mm^2) erfasst wurde. Die DAPI-gefärbten Zellkerne auf diesen Aufnahmen wurden gezählt und deren Anzahl pro mm^2 und pro Well (A = 30,2 mm^2 bei einem Welldurchmesser von 6,2 mm) kalkuliert. Die Anzahl der Zellen eines konfluenten Monolayers der verschiedenen Zelllinien pro mm^2 ist in Tab. 16 aufgelistet.

Tab 16: Anzahl der Zellen konfluenter Monolayer pro Well einer 96-Well-Platte.

Zelllinie	Anzahl Zellen pro mm^2	Anzahl Zellen pro Well (gerundet)
Caco2	2.067,74	62.400
5637	2.702,34	81.600
IPEC-J2	662,46	20.000
PK-15	5.271,34	159.100

4.5.2.6 Detektion adhärenter *Escherichia coli* auf Epithelzellen

PI färbt sowohl DNA und zytoplasmatische Strukturen in nicht lebenden eukaryotischen Zellen als auch Bakterien. Bakterien fluoreszieren jedoch wesentlich intensiver. Um die Anzahl adhärenter Bakterien bestimmen zu können, wurde ein Bildverarbeitungsalgorithmus entwickelt, der in der Lage war, *E. coli* von dem Zellhintergrund zu differenzieren. Die Breite der stäbchenförmigen *E. coli* beträgt bei einer 20-fachen Vergrößerung drei bis fünf Pixel. Die Länge der Bakterien hängt von deren Lage ab. In den Zellen kommen solche Strukturen kaum vor. Ein nichtlinearer Bildfilter verstärkte spezifisch alle Strukturen dieser Dimension und dämpfte alle anderen Bildstrukturen. Nach dieser Vorfilterung verblieben in der Aufnahme fast nur noch Bakterien und kleinteilige Störungen vor homogenem Hintergrund. Auf diesem Zwischenbild konnte eine konventionelle Objekterkennung mit dynamisch angepasster Binarisierungsschwelle erfolgen. Aus der Liste der detektierten Objekte wurden alle Objekte ausgeschlossen, deren Form, Größe oder Färbungsintensität nicht zu *E. coli* passten. Somit wurden verbliebene Störungen und Artefakte eliminiert. Die verbliebene Anzahl von Objekten stellt die Anzahl der *E. coli* im Bild dar. Um eine statistische Sicherheit zu erreichen, wurden mehrere Aufnahmen von einem Well ausgewertet, bis eine vordefinierte Mindestfläche von 0,3 mm² bearbeitet war. Um vergleichbare Anzahlen auf unterschiedlichen Zelllinien zu erhalten, wurde die detektierte absolute Bakterienanzahl in Bakterien/mm² umgerechnet. Nach der automatischen Positionierung der Kavität erfolgte die Fokussierung mit 20-facher Vergrößerung auf die Mitte der Kavität, wobei die Messungen auf 96-Well-Platten angepasst wurden. Die Bilder wurden automatisch aufgenommen und als *Windows Bitmap File* (bmp) gespeichert. Die Parameter des Algorithmus konnten für jede der zu untersuchenden Zelllinien optimiert werden (Frömmel *et al.* 2013b).

4.5.2.7 Detektion der Adhäsionsmuster von *Escherichia coli* auf Epithelzellen

Zur Detektion von Adhäsionsmustern wie Mikrokolonien, Ketten oder einer diffusen Verteilung adhärenter Bakterien erfolgte eine visuelle Auswertung der während der Detektion adhärenter Bakterien aufgenommenen Bilder (Frömmel *et al.* 2013a).

4.5.3 AKLIDES®-Fluoreszenzmikroskopie

4.5.3.1 Fluoreszenz-Imaging-Technologie

Das Konzept der AKLIDES®-Imaging-Technologie basierte auf Fokussierungsalgorithmen der VideoScan-Technologie (Abs. 4.5.2). AKLIDES® wurde als vollautomatisches Interpretationssystem von ANCA IIF Mustern, basierend auf mathematischen Softwarealgorithmen zur Mustererkennung entwickelt (Hiemann *et al.* 2009). Die Hardware der AKLIDES®-Technologie entsprach der des VideoScan-Systems. Jedoch wurden hier als Lichtquelle 400 nm und 490 nm lichtemittierende Dioden

(LED) eingesetzt. Die Software des Interpretationssystems enthielt Module zur Geräteansteuerung, zum Autofokus und zur Bildanalyse. DAPI gefärbte Objekte, wie Zellkerne oder Mikropartikel, dienten der Fokussierung, Qualitätskontrolle und Objekterkennung.

4.5.3.2 Analyse der Zytotoxizität von *Escherichia coli*

Zur Analyse der Zytotoxizität von *E. coli*, d.h. zur Auswertung der Zytotoxizitätsassays (Abs. 4.4.6), wurde die AKLIDES®-Software für diese Anwendung adaptiert. Die Färbung der nach dem Zytotoxizitätsassay verbliebenen fixierten Zellen erfolgte im Rahmen dieses Assays sowohl mit DAPI als auch mit PI. Die fluoreszierenden Objekte wurden mittels LED-Anregung mit dem entsprechenden Filtersatz für die Fluoreszenzfarbstoffe (DA/FI-A) detektiert. Die Aufnahmen und Messungen folgten einem iterativen Ablauf. Nach der automatischen Positionierung der Kavität erfolgte eine einmalige Grobfokussierung des Präparates in der Mitte der Kavität im DAPI-Kanal mit 10-facher Vergrößerung (Olympus semi-apochromat LUCPLFLN 10X, 0,30 NA, W.D. 1,0 mm). Anschließend erfolgte die Feinfokussierung i) im DAPI- und ii) im PI/FITC-Kanal mit jeweils anschließender Bildspeicherung als *Tagged Image File* (TIF). Die Analyse der PI/FITC Bilder erfolgte durch Berechnung eines globalen Zell/Hintergrund-Schwellwertes anhand des entsprechenden Bildhistogramms, um eine Binarisierung des Grauwertbildes zu erstellen. Die Pixel oberhalb des Schwellwertes wurden gezählt. In jeder Kavität wurden fünf unabhängige Bereiche von jeweils 0,603 mm², im Zentrum beginnend, dann jeweils zwei Flächen links und rechts daneben, aufgenommen und zur Analyse herangezogen. Somit ergab sich eine Gesamtmessfläche von 3,015 mm². Als finaler Messwert wurde der Median aus den Messwerten der fünf Einzelaufnahmen ausgegeben. Dieser entsprach der Prozentzahl des nicht zerstörten Zellmonolayers.

4.6 Statistische Methoden

P-Werte zur Signifikanz phylogenetischer Gruppen innerhalb der *E. coli* aus verschiedenen Arten wurden mittels Pearson's Chi-Quadrat Test (SPSS; Version 17.0, Chicago, USA) kalkuliert. Mittels Wilcoxon-Test wurde die Adhäsionsrate der Isolate aus den verschiedenen Arten sowie eine Assoziation zwischen dem Auftreten von VAGs und der Adhäsion an Epithelzellen analysiert. Diese Analysen erfolgten mittels RKWard, Version 0.57 mit dedizierten R-Packages und der Datenbank angepassten Skripts oder RKWard Plugins (Rödiger *et al.* 2012a). Mittels Fisher's-exact-Test (MedCalc® Version 11.4.2.0) wurde die Häufigkeit von VAGs innerhalb definierter Gruppen verglichen. Mittels Wilcoxon-Test (MedCalc® Version 11.4.2.0) wurden P-Werte zur Signifikanz der Zytotoxizität hämolytischer Isolate kalkuliert.

5. Ergebnisse

5.1 Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay

5.1.1 Prinzip des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays

Es wurden Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays (MPMA) zur simultanen Detektion von jeweils drei bis neun Genen des Darmbakteriums *E. coli* entwickelt (Frömmel *et al.* 2013b). Hierfür wurden acht mikropartikelbasierte Multiplex-PCRs (mPCRs) für die Detektion von 30 exVAGs, 14 inVAGs und zwei DNA-Sequenzen zur phylogenetischen Einordnung zusammengestellt (Tab. 6). Der MPMA erfolgte auf der Basis direkter DNA-Hybridisierung (Dunbar 2006), wobei ein DNA-Strang mittels CyTM5-markiertem Primer markiert wurde. Der markierte DNA-Strang war komplementär zur entsprechenden Oligonukleotidsonde, welche an jeweils eine bestimmte Mikropartikelpopulation (PolyAn GmbH, Deutschland) gekoppelt wurde (Abs. 4.3.1). Im Anschluss an die PCR hybridisierten die Oligonukleotidsonde und der CyTM5-markierte DNA-Strang. Eine mPCR-Reaktion wurde in einem Well einer 96-Well-Platte durchgeführt. Das Prinzip des MPMA ist in Abb. 3, die Arbeitsschritte sind in Tab. 17 zusammengefasst. Parameter der *in silico* Analysen sind Frömmel *et al.* 2011 zu entnehmen.

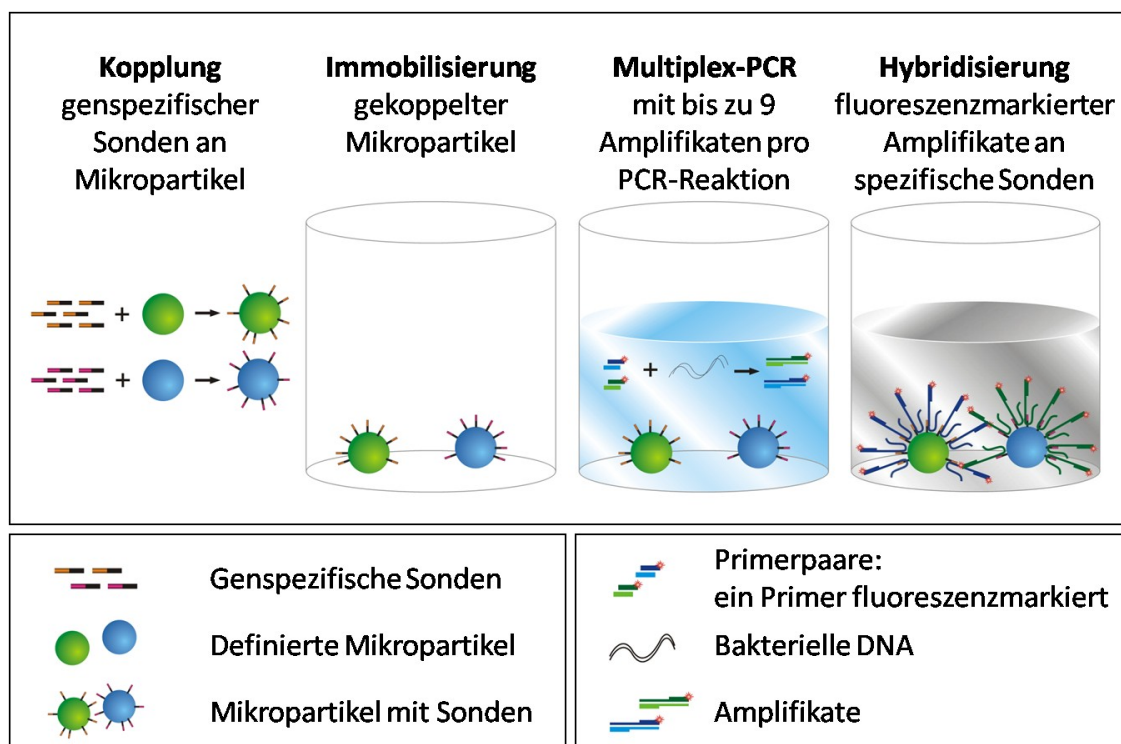


Abb. 3: Schematische Darstellung des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays. Genspezifische Oligonukleotidsonden wurden an definierte Mikropartikelpopulationen gekoppelt und auf dem Boden der Kavität immobilisiert. Anschließend erfolgte die mPCR, wobei jeweils ein Amplifikatstrang mittels fluoreszenzmarkiertem Primer markiert wurde. Die Hybridisierung der markierten Stränge an die spezifischen Oligonukleotidsonden fand direkt im Anschluss an die mPCR statt. Aus einer Hybridisierung resultierte eine Fluoreszenzkorona um die Mikropartikel. Reagenzien und nicht hybridisierte Sequenzen wurden danach aus der Kavität entfernt. Abbildung modifiziert nach Frömmel *et al.* 2011.

Tab. 17: Arbeitsschritte des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays. Aus Frömmel *et al.* 2011.

<p>Probenvorbereitung Aufschluss der Bakterien zur Freisetzung von Plasmiden und genomischer DNA.</p>
<p>Präparation der Mikropartikel Kopplung genspezifischer Oligonukleotidsonden an die Mikropartikel: Jede Oligonukleotidsonde wurde an eine spezifische Mikropartikelpopulation gekoppelt. Pro mPCR-Ansatz wurden jeweils fünf bis elf Mikropartikelpopulationen eingesetzt. Nach der Kopplung erfolgte das Zusammenführen der Mikropartikel entsprechend der mPCRs.</p>
<p>Immobilisierung der Mikropartikel Die mit Oligonukleotidsonden gekoppelten Mikropartikel jeder einzelnen mPCR wurden am Boden einer 96-Well-Platte fixiert. Die mPCR, die Hybridisierung und die Messung erfolgten in dieser Platte.</p>
<p>Multiplex-PCR Die Amplifikation 46 verschiedener bakterieller Gen-Fragmente erfolgte in acht verschiedenen mPCR-Ansätzen. Es wurden jeweils drei bis neun Gene innerhalb einer mPCR simultan amplifiziert. Die Markierung jeweils eines der DNA-Stränge erfolgte mittels CyTM5-fluoreszenzmarkierter Primer während der mPCR.</p>
<p>Multiplex-Hybridisierung Direkt im Anschluss an die mPCR hybridisierten die fluoreszenzmarkierten Amplifikatstränge mit deren homologen genspezifischen Oligonukleotidsonden, welche an Mikropartikel gekoppelt und am Boden der Messplatte immobilisiert waren. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die nicht hybridisierten Reagenzien von den Mikropartikeln gewaschen.</p>
<p>Messung der Fluoreszenzintensität Das Fluoreszenzsignal wurde mittels VideoScan-Technologie detektiert, indem es als Korona um die Mikropartikel wahrgenommen wurde. Der Messwert wurde als referenzierte mittlere Fluoreszenzintensität (refMFI) ausgegeben.</p>

5.1.2 Reproduzierbarkeit des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays

Nach der Etablierung des MPMA im Testformat wurde dessen Reproduzierbarkeit anhand der Untersuchung zuvor charakterisierter *E. coli*-Isolate nachgewiesen. Hierbei wurden die Ergebnisse der mPCRs sowohl nach Detektion mittels VideoScan als auch mittels Agarosegelelektrophorese (AGE), dem Standardnachweisverfahren für PCRs, verglichen. Beispielhaft ist dies in Abb. 4 für drei Lysate dargestellt. Diese Abbildung wurde bereits in Rödiger *et al.* 2012 veröffentlicht (Rödiger *et al.* 2012b).

5.1.3 Semiquantitativer Nachweis der Amplifikate

Die referenzierte mittlere Fluoreszenzintensität (refMFI) korrelierte mit der Menge des hybridisierten Amplifikates und erlaubte demzufolge eine relative Aussage über dessen Quantität (Frömmel *et al.* 2011; Rödiger *et al.* 2012b). Dies wurde mittels MPMA mit definierter Konzentration an Template-DNA gezeigt. Beispielhaft wurde dies bereits für die Gene *iucD*, *cvi/cva* und *papC* veröffentlicht (Rödiger *et al.* 2012b) (Abb.5). Im Bereich unter 5 ng Template-DNA korrelierte die refMFI

mit der AGE-Bandenintensität. Mittels AGE war der Nachweis der Amplifikate für Template-Konzentrationen erst oberhalb 0,83 ng, mittels VideoScan schon oberhalb 0,5 ng möglich.

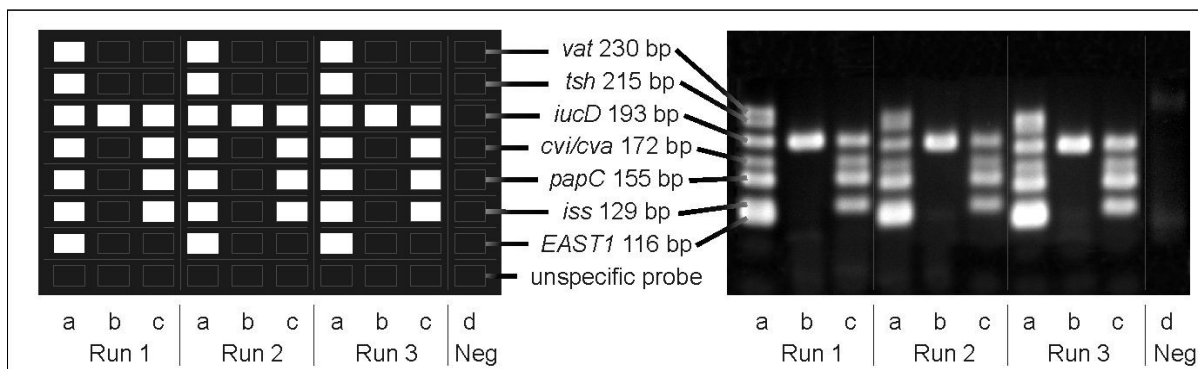


Abb. 4: Reproduzierbarkeit des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays. Vergleich der Ergebnisse dreier Wiederholungen (Run 1-3) der simultanen Amplifikation von 7 exVAGs (Bezeichnung der exVAGs und Fragmentlänge (bp) in der Legende; EAST1 entspricht *astA*). Links: Detektion mittels VideoScan, Rechts: Detektion mittels AGE. Als Negativkontrolle wurde eine unspezifische Sonde an Mikropartikel gekoppelt (*unspecific probe*). Die Reproduzierbarkeit wird hier beispielhaft für drei *E. coli*-Stämme IMT2470 (a), P6372 (b), P6530 (c) gezeigt. Positive Ergebnisse mittels VideoScan (refMFI) (weiße Boxen links im Bild) und das Bandenmuster im AGE-Bild entsprechen einander. (d): Negativkontrolle ohne Lysat (Neg). Abbildung veröffentlicht in Rödiger *et al.* 2012b.

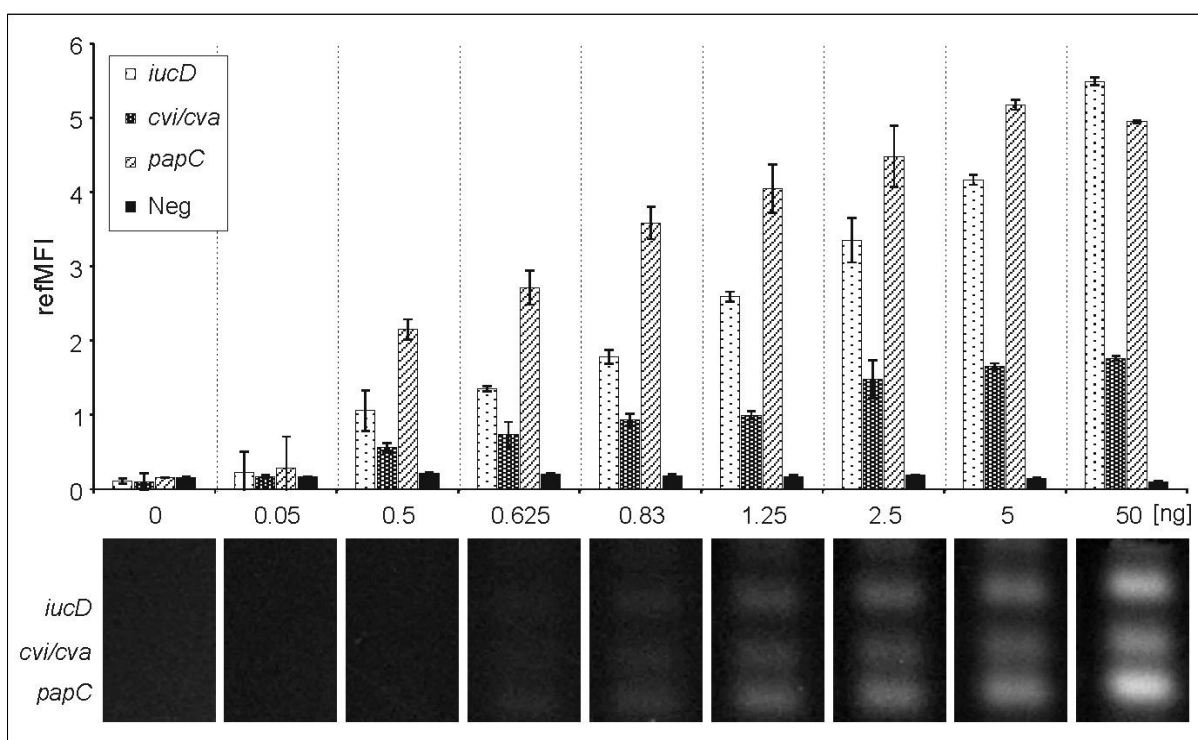


Abb. 5: Detektionslimit des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays. Eine mPCR wurde mittels MPMA mit unterschiedlicher Template-DNA-Konzentration (x-Achse) durchgeführt. Die Amplifikate wurden mittels VideoScan (oben, refMFI) und AGE (unten, AGE-Bilder) detektiert. Mittels VideoScan erfolgte der Nachweis der Amplifikate oberhalb 0,5 ng Template-DNA, mittels AGE oberhalb 0,83 ng. Neg: Negativkontrolle, bei der eine unspezifische Oligonukleotidsonde an eine Mikropartikelpopulation gekoppelt wurde. Abbildung veröffentlicht in Rödiger *et al.* 2012b.

5.1.4 Lagerung immobilisierter Mikropartikel

In Vorbereitung auf das Screening der 398 *E. coli*-Isolate wurde die Lagerfähigkeit der produzierten MPMA-Platten inklusive der Haftung der immobilisierten Mikropartikel am Boden der Kavitäten und der refMFI nach einer Lagerung bei 4°C sowie bei Raumtemperatur über zehn Wochen untersucht. Im Gegensatz zu den bei Raumtemperatur gelagerten Platten kam es auf Platten, die bei 4°C gelagert wurden zu Mikropartikelverlusten. Die Lagerungstemperatur hatte keinen Einfluss auf die refMFI (Abb. 6). Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigten die Lagerfähigkeit immobilisierter Mikropartikel ohne qualitative und quantitative Einbußen über einen Zeitraum von zehn Wochen bei Raumtemperatur. Während der darauffolgenden Screenings wurde die Lagerfähigkeit der immobilisierten Mikropartikel bis über drei Monate nachgewiesen.

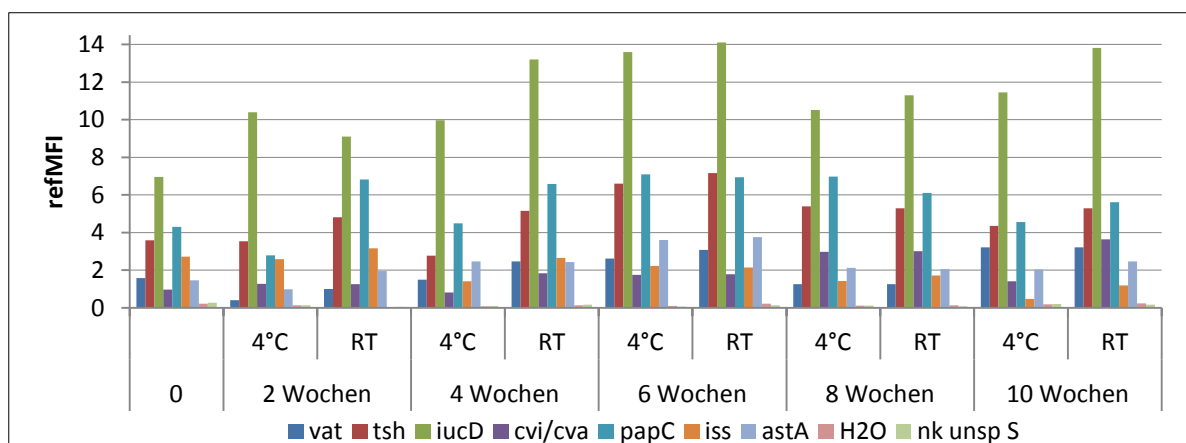


Abb. 6: Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Fluoreszenzintensität. Dargestellt ist die refMFI nach MPMA mit 7 exVAGs (Legende unten) bei Lagerung der immobilisierten Mikropartikel über 10 Wochen bei 4°C und Raumtemperatur (RT). Die exVAGs sind zu jedem Messzeitpunkt unabhängig der Lagerungstemperatur detektierbar. Nk unsp S: Negativkontrolle, bei der eine unspezifische Oligonukleotidsonde an eine Mikropartikelpopulation gekoppelt wurde. H₂O: Negativkontrolle mit Mikropartikelpopulation ohne Oligonukleotidsonde.

5.2 Virulenzassoziierte Gene des Darmbakteriums *Escherichia coli*

5.2.1 Virulenzassoziierte Gene und Phylogenie nicht hämolytischer *Escherichia coli*

Es wurden 317 nicht hämolytische Isolate aus Menschen (n=39), 14 Säugetierarten (n=224) und vier Vogelarten (n=54) analysiert (Tab. 3)(Frömmel *et al.* 2013b). Die durchschnittliche Anzahl der exVAGs der Isolate aus einer Art ist in Abb. 7 dargestellt. Die Prävalenz der VAGs innerhalb der Isolate der einzelnen Arten ist in Tab. 18 zusammengefasst. Jedes der 30 exVAGs wurde in mindestens einem Isolat nachgewiesen. Die höchste Prävalenz wurde für die exVAGs *ompA* (100%), *fimC* (95%) und *csgA* (91%) ermittelt. Die niedrigste Prävalenz wurde für die exVAGs *afa/dra* (0,6%), *cnf1/2* (0,6%) und *sat* (2,8%) ermittelt. Es waren einzelne exVAGs in bestimmten Arten hoch prävalent, z.B. *ireA* mit 87% in Isolaten aus Rehen, wurden jedoch in Isolaten anderer Spezies, wie z.B. im

Rotfuchs, Braunbrustigel oder Mäusebussard, nicht nachgewiesen (Details in Tab. 18 und Frömmel *et al.* 2013b).

Tab. 18: Prävalenz der VAGs (%) in nicht hämolytischen und hämolytischen *E. coli*-Isolaten in Abhängigkeit der Art. Nicht nachgewiesene VAGs (*fanA*, *fedA*, *fasA*, *faeG*, *fimF41a*, *ipaH*, *eltB1p*, *aggR*) sind nicht in der Tabelle aufgeführt.

Funktion	Arten → VAGs ↓	Prävalenz der VAGs in nicht hämolytischen <i>E. coli</i> Isolaten																				in hämolytischen <i>E. coli</i> Isolaten										
		Mensch, intestinal	Mensch, UTI	Hauschwein, intestinal	Hauschwein, UTI	Reh	Braunbrustigel	Feldhase	Fischotter	Marder	Dachs	Hausmaus	Wildkaninchen	Waschbär	Wanderratte	Eichhörnchen	Wildschwein	Rotfuchs	Sperber	Waldohreule	Mäusebussard	Amsel	Mensch, intestinal	Mensch, UTI	Hauschwein, intestinal	Reh	Marder	Waschbär	Rotfuchs	Stockente		
Anzahl Isolate		19	20	22	15	23	22	8	7	19	7	9	6	22	4	17	22	21	13	5	14	22	13	13	13	8	6	10	5	13		
eVAGs	Adhäsion	<i>afa/dra</i>	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		<i>csgA</i>	100	100	86	93	91	86	88	86	74	100	100	83	77	100	100	100	90	92	80	93	91	100	100	85	100	100	100	100		
		<i>fimC</i>	89	90	91	93	100	91	100	100	95	100	100	83	95	100	94	100	100	100	100	100	100	91	100	100	100	100	100	100	100	
		<i>hra</i>	5	30	14	0	57	45	13	29	37	43	11	0	9	25	35	36	52	8	20	79	41	85	100	46	100	100	80	80	92	
		<i>mat</i>	68	100	82	93	96	86	75	71	79	100	100	67	77	100	94	9	95	92	60	93	82	100	100	69	100	100	100	100	100	
		<i>papC</i>	5	35	5	0	0	0	0	14	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	69	77	38	100	83	90	80	77	
		<i>sfa/foc</i>	16	20	14	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	6	0	5	23	0	14	0	92	85	38	100	100	30	80	85
		<i>tsh</i>	5	15	27	33	0	5	0	0	0	0	0	33	14	0	0	0	0	15	0	21	23	8	8	46	0	0	0	0	8	
	Invasin	<i>ibeA</i>	32	15	5	0	0	0	0	14	11	86	22	0	23	50	47	14	5	38	20	36	27	38	62	23	50	33	90	40	15	
		<i>tia</i>	5	10	0	0	78	0	0	0	11	14	0	0	0	0	24	5	10	15	0	29	18	15	15	0	0	0	0	0	0	
	Toxin	<i>astA</i>	0	20	18	7	65	14	13	29	26	29	56	17	27	0	29	36	29	23	60	14	36	8	15	0	13	0	0	0	15	
		<i>cnf1/2</i>	0	5	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	100	38	63	100	90	100	92	
		<i>hlyA</i>	0	5	0	0	9	5	0	0	0	0	11	17	5	0	6	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	
		<i>sat</i>	16	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	23	0	0	0	0	0	0	0
		<i>vat</i>	26	30	9	0	22	0	0	14	16	0	33	0	23	50	47	0	10	23	20	14	32	85	85	31	50	100	90	80	85	
	Protektin	<i>cvi/cva</i>	21	30	36	33	9	0	0	14	0	43	0	0	9	0	0	0	8	0	0	0	23	23	0	13	0	10	0	8		
		<i>iss</i>	26	45	23	33	4	0	0	14	0	14	0	0	5	0	0	0	8	0	0	0	38	23	8	0	0	10	60	23		
		<i>ompA</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
		<i>traT</i>	42	70	55	73	65	18	63	57	21	57	78	50	27	75	47	41	24	62	60	21	32	54	54	69	13	33	40	40	23	
	Siderophor	<i>chuA</i>	53	70	23	0	57	32	25	29	53	43	22	50	50	50	65	27	29	62	80	71	55	92	100	38	100	100	100	80	85	
		<i>fyuA</i>	47	75	23	33	26	9	0	14	21	14	0	0	27	50	53	18	14	46	20	21	55	92	100	31	88	100	100	100	92	
		<i>ireA</i>	5	15	9	0	87	0	0	0	5	0	0	0	5	0	6	5	0	8	0	0	9	15	8	0	13	50	80	0	15	
		<i>iroN</i>	37	55	32	33	0	5	13	0	16	57	0	0	9	25	6	23	5	38	20	21	23	100	100	38	100	100	40	100	92	
		<i>irp2</i>	58	75	32	33	30	5	0	14	21	29	0	0	27	50	47	18	14	46	20	21	36	92	100	38	100	100	100	100	92	
		<i>iucD</i>	37	65	32	40	0	0	0	14	0	43	0	0	9	0	0	0	0	15	0	0	5	23	46	8	0	0	0	0	8	
		<i>iutA</i>	32	60	23	40	0	0	0	14	0	43	0	0	9	0	0	0	0	15	0	0	9	23	46	8	0	0	0	0	8	
		<i>sitchr</i>	63	75	14	27	13	23	13	29	26	29	0	0	32	50	47	5	10	31	20	36	32	85	92	38	50	100	90	20	77	
		<i>sitcp</i>	37	45	64	93	0	0	0	29	5	43	0	0	9	0	0	0	0	23	0	0	5	15	15	8	0	0	0	0	8	
Sonst.	<i>malX</i>	42	30	5	7	39	5	0	0	16	29	0	0	27	25	41	5	10	31	20	21	27	92	92	38	50	100	90	100	85		
	<i>pic</i>	0	10	9	0	30	0	0	14	5	0	78	0	0	50	41	0	10	15	0	36	5	15	69	8	100	33	0	20	23		
iVAGs	Adh	<i>daaD</i>	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>caeA</i>	0	0	0	0	0	5	38	0	16	14	0	17	9	0	12	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Toxin	<i>est1</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>est2</i>	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>stx1</i>	5	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>stx2e</i>	0	0	0	0	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	8		

***E. coli* aus Menschen.** In den Isolaten aus dem Urin harnwegserkrankter Menschen (*urinary tract infection*, UTI) wurden alle 30 der in die Analyse einbezogenen exVAGs detektiert, wobei diese

Isolate mit 13,3 exVAGs die höchste durchschnittliche Anzahl an exVAGs pro Isolat aufwiesen. In den intestinalen Isolaten aus Menschen wurden insgesamt 26 exVAGs detektiert. Hier wurden durchschnittlich 9,74 exVAGs pro Isolat nachgewiesen (Abb. 7). Die exVAGs *papC* und *mat* wurden in Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Menschen häufiger als in intestinalen Isolaten nachgewiesen ($p < 0,05$). Die exVAGs *afa/dra* und *sat* wurden exklusiv in Isolaten aus Menschen nachgewiesen.

E. coli aus Hausschweinen. In den intestinalen Isolaten von Hausschweinen wurden 25 der 30 analysierten exVAGs (durchschnittlich 8,27 exVAGs pro Isolat), in den Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Hausschweine wurden 18 exVAGs (durchschnittlich 8,73 exVAGs pro Isolat) nachgewiesen (Abb. 7). Das exVAG *sitE* wurde in Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Hausschweine häufiger als in intestinalen Isolaten gesunder Hausschweine nachgewiesen ($p < 0,05$). Das exVAG *cnf1/2* wurde exklusiv in Isolaten aus Menschen und Urin harnwegserkrankter Hausschweine detektiert.

E. coli aus Wildtieren. In den Isolaten aus Sperbern wurde von allen Wildtierarten (17 Arten, 241 Isolate) das größte Spektrum an exVAGs (25 von 30 analysierten exVAGs) detektiert. Die höchste durchschnittliche Anzahl an exVAGs pro Isolat wurde jedoch in Isolaten aus Dachsen nachgewiesen (10,43 exVAGs). In den Isolaten aus Wildkaninchen wurde das niedrigste Spektrum (9 von 30 exVAGs) sowie die niedrigste durchschnittliche Anzahl an exVAGs pro Isolat (5 exVAGs) detektiert (Abb. 7). Die exVAGs *sfa/foc*, *ibeA*, *irp2* ($p < 0,05$), *chuA* und *iroN* ($p < 0,01$) sowie *tsh* und *fyuA* ($p < 0,005$) wurden in Isolaten aus Wildvögeln häufiger als in Isolaten aus Wildsäugern nachgewiesen.

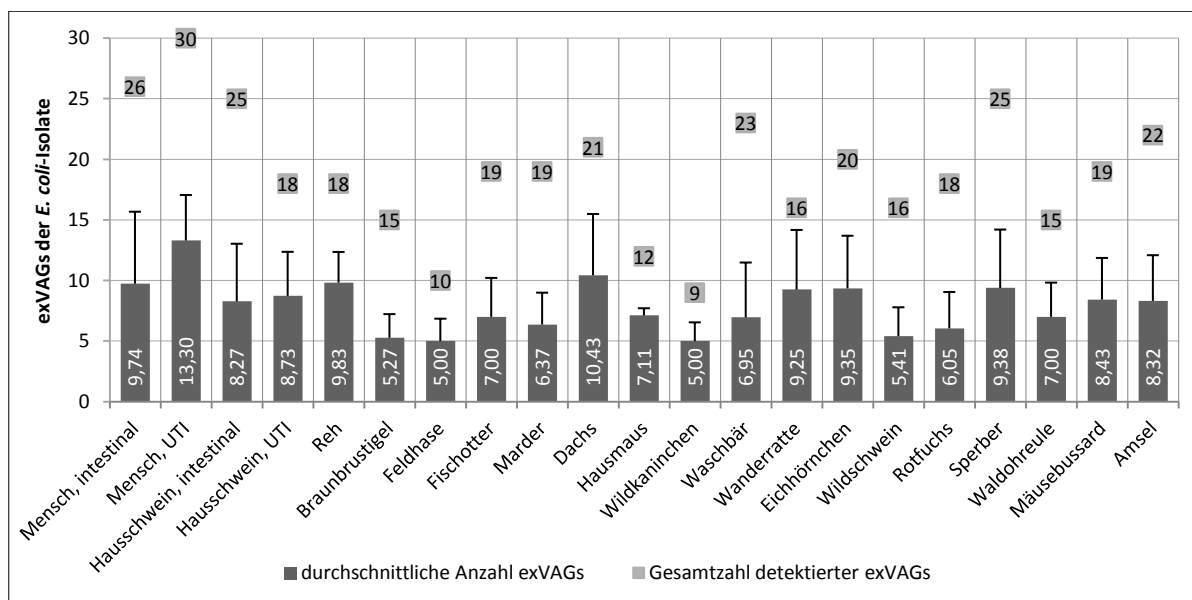


Abb. 7: exVAGs in nicht hämolytischen E. coli-Isolaten. Es wurde auf 30 exVAGs getestet. Die Balken zeigen die durchschnittliche Anzahl exVAGs der Isolate aus einer Art. Die Zahlen in den Quadraten bedeuten, dass von den 30 exVAGs die entsprechende Anzahl exVAGs nachgewiesen werden konnten (Spektrum).

Phylogenie. Die Isolate gehörten den Phylogruppen B1 (n=109, 34%), D (n=74, 23%), A (n=69, 22%) und B2 (n=65, 21%) an. Die artspezifische Verteilung der Phylogruppen ist in Tab. 19 aufgelistet. Isolate aus Menschen (intestinal und UTI) waren überwiegend B2- ($p < 0,05$), Isolate aus Wildsäugern B1- ($p < 0,05$) und Isolate aus Wildvogelarten D-Stämme ($p < 0,001$). Isolate aus gesunden Hausschweinen waren überwiegend A-Stämme ($p < 0,05$). Die Isolate aus Urin harnwegserkrankter Hausschweine waren ausschließlich A- und B1-Stämme. Die höchste durchschnittliche Anzahl an exVAGs wurde in B2-Stämmen nachgewiesen (13,0 exVAGs/Isolat). Es folgten die Isolate der Gruppe D (8,1 exVAGs), B1 (6,5 exVAGs) und A (5,4 exVAGs). Die exVAGs *mat*, *ibeA*, *fyuA*, *iroN*, *irp2*, *malX*, *pic* und *vat* wurden in B2-Stämmen häufiger nachgewiesen als in A-, B1- und D-Stämmen ($p < 0,05$) (Frömmel *et al.* 2013b).

Tab. 19: Phylogenie der Isolate nicht hämolytischer und hämolytischer *E. coli* in Abhängigkeit der Art.

Art	Nicht hämolytische <i>E. coli</i>						Hämolytische <i>E. coli</i>					
	Anzahl Isolate	VAGs /Isolat (MW)	Phylogruppe (%)				Anzahl Isolate	VAGs /Isolat (MW)	Phylogruppe (%)			
			A	B1	B2	D			A	B1	B2	D
Mensch												
Mensch, intestinal	19	10	37	11	42	11	13	17	0	8	92	0
Mensch, UTI	20	13	5	25	45	25	13	19	0	0	100	0
Haustiere Säuger												
Hausschwein, intestinal	22	8	73	5	5	18	13	11	62	0	38	0
Hausschwein, UTI	15	9	53	47	0	0						
Wildtiere Säuger												
Reh	23	10	4	39	17	39	8	16	0	0	100	0
Braunbrustigel	22	5	27	41	5	27						
Feldhase	8	5	13	75	0	13						
Fischotter	7	7	43	29	14	14						
Marder	19	6	32	16	26	26	6	17	0	0	100	0
Dachs	7	11	0	57	29	14						
Hausmaus	9	7	0	78	0	22						
Wildkaninchen	6	5	33	17	17	33						
Waschbär	22	7	23	27	23	27	10	16	0	0	100	0
Wanderratte	4	9	0	50	25	25						
Eichhörnchen	17	10	6	29	47	18						
Wildschwein	22	5	23	50	14	14						
Rotfuchs	21	6	14	57	14	14	5	16	0	20	80	0
Wildtiere Vögel												
Sperber	13	9	8	31	31	31						
Stockente							13	16	8	8	85	0
Waldohreule	5	7	0	20	0	80						
Mäusebussard	14	9	7	29	21	43						
Amsel	22	8	9	36	27	27						

5.2.2 Virulenzassoziierte Gene und Phylogenie hämolytischer *Escherichia coli*

Es wurden 81 hämolytische *E. coli*-Isolate aus Menschen (n=26), aus fünf Säugetierarten (n=42) und aus Stockenten (n=13) analysiert (Tab. 3). Die Prävalenz der einzelnen VAGs innerhalb der

Isolate der einzelnen Arten ist in Tab. 18 zusammengefasst. Die durchschnittliche Anzahl der exVAGs der Isolate aus einer Art ist in Abb. 8 dargestellt. Außer *afa/dra* wurden alle der mittels MPMA analysierten 30 exVAGs in mindestens einem Isolat nachgewiesen. Die höchste Prävalenz wurde für die Adhäsiogene *fimC* (100%), *csgA* (98%), *mat* (96%), *hra* (85%), *papC* (77%) und *sfa/foc* (76%) detektiert. Neben *hlyA* (100%) waren die Toxingene *cnf1/2* (84%) und *vat* (76%) hoch prävalent. Zudem wurde das VAG *ompA* (100%) in jedem Isolat detektiert.

E. coli aus Menschen. In den Isolaten aus Menschen (intestinal und UTI) wurde das größte Spektrum an exVAGs (29 von 30 analysierten exVAGs) detektiert (Abb. 8). Die exVAGs *papC* und *pic* wurden in Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Menschen häufiger nachgewiesen als in intestinalen Isolaten aus Menschen ($p < 0,05$). Die exVAGs *tia* und *sat* wurden ausschließlich in Isolaten aus Menschen detektiert.

E. coli aus Hausschweinen. In den intestinalen Isolaten aus Hausschweinen wurden zwar mit einem Spektrum von 25 exVAGs vergleichsweise viele exVAGs detektiert, jedoch wiesen die einzelnen Isolate aus Hausschweinen mit durchschnittlich 10,5 exVAGs die niedrigste durchschnittliche Anzahl an exVAGs pro Isolat auf (Abb. 8).

E. coli aus Wildtieren. In Isolaten aus Stockenten wurde mit 27 der 30 exVAGs, nach Isolaten aus Menschen, das größte Spektrum an exVAGs detektiert (Abb. 8). Das exVAG *fyuA* wurde in Isolaten aus Wildsäugern häufiger detektiert als in Isolaten aus Stockenten ($p < 0,05$).

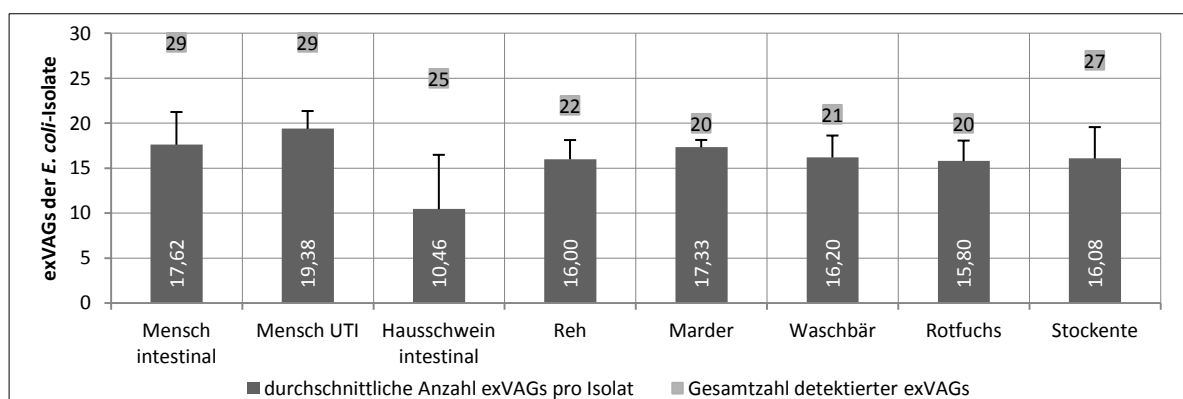


Abb. 8: exVAGs in hämolytischen *E. coli*-Isolaten. Es wurde auf 30 exVAGs getestet. Die Balken zeigen die durchschnittliche Anzahl exVAGs der Isolate aus einer Art. Die Zahlen in den Quadraten bedeuten, dass von den 30 exVAGs die entsprechende Anzahl exVAGs nachgewiesen werden konnten (Spektrum).

Phylogenie. Die Isolate gehörten den Phylogruppen B2 ($n=69$, 85%), A ($n=9$, 11%) und B1 ($n=3$, 4%) an. D-Stämme wurden nicht detektiert. Die artspezifische Verteilung der Phylogruppen ist in Tab. 19 aufgelistet. Isolate aus Menschen, Wildsäugern und Stockenten waren überwiegend B2-Stämme ($p < 0,05$). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen humanen intestinalen Isolaten

und Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Menschen. Acht (62%) der intestinalen Isolate aus Hausschweinen waren A-Stämme. Wie in nicht hämolytischen Isolaten wurde die höchste durchschnittliche Anzahl exVAGs in B2-Stämmen nachgewiesenen (17,4 VAGs/Isolat). Es folgten die Isolate der Gruppe B1 (13,7 VAGs) und A (6,3 VAGs). In B2-Stämmen wurden signifikant häufiger als in A- und B1-Stämmen die exVAGs *hra*, *sfa/foc*, *chuA*, *irp2*, *traT*, *vat* und *malX* nachgewiesen ($p < 0,05$).

5.2.3 Virulenzassoziierte Gene und *Escherichia coli*-Pathotypen

Für die Charakterisierung von *E. coli* wurden neben fünf mPCRs zur Detektion von exVAGs zwei mPCRs zum Nachweis von insgesamt 14 inVAGs in den MPMA integriert (Frömmel *et al.* 2013b). Mit folgenden inVAGs ist es möglich, *E. coli*-Isolate in bestimmte Pathotypen einzuordnen: EPEC (*eaeA*), STEC (*stx1* und/oder *stx2*), EHEC (*stx1* und/oder *stx2*, *eaeA*), ETEC (*eltB* und/oder *est1* und/oder *est2*), DAEC (*daaD*), EAEC (*aggR*) und EIEC (*ipaH*) (Vidal *et al.* 2005; Guion *et al.* 2008; Croxen und Finlay 2010).

In den nicht hämolytischen *E. coli* wurde in 30 Isolaten (9,5%) mindestens ein inVAG mit folgender Prävalenz nachgewiesen: *eaeA* (4,4%), *stx2e* (2,8%), *stx1* (0,9%), *est2* (0,6%), *daaD* (0,6%) und *est1* (0,6%). Acht der vierzehn inVAGs (*fanA*, *fedA*, *fasA*, *faeG*, *fimF41a*, *ipaH*, *eltB1p*, *aggR*) wurden nicht nachgewiesen. Die Kollektion nicht hämolytischer *E. coli* beinhaltet vierzehn EPEC, zehn STEC, vier ETEC und zwei DAEC (Tab. 20). Zwei der EPEC, jeweils aus einem Wildkaninchen und einem Braunbrustigel, wurden als tEPEC identifiziert. Atypische EPEC wurden mit jeweils drei Isolaten am häufigsten aus Feldhasen und Mardern isoliert. Nicht hämolytische STEC wurden aus Rehen (7 Isolate *stx2e*⁺, 2 Isolate *stx1*⁺/*stx2e*⁺) und einem gesunden Menschen (*stx1*⁺) isoliert. Die vier ETEC wurden jeweils aus einem Hausschwein (*est2*⁺), einem Reh, einem Rotfuchs (beide *est1*⁺) und einem Menschen mit UTI (*est2*⁺) isoliert. Jeweils ein Isolat aus gesunden und erkrankten Menschen wurde als *daaD*⁺ DAEC identifiziert (Frömmel *et al.* 2013b).

Tab. 20: Zuordnung der nicht hämolytischen (H-) und hämolytischen (H+) *E. coli*-Isolate zu Pathotypen.

	Art	Mensch, intestinal	Mensch, UTI	Hausschwein, intestinal	Hausschwein, UTI	Reh	Braunbrustigel	Feldhase	Fischotter	Marder	Dachs	Hausmaus	Wildkaninchen	Waschbär	Wanderratte	Eichhörnchen	Wildschwein	Rotfuchs	Sperber	Stockente	Waldohreule	Mäusebussard	Amsel	Summe	
		19	20	22	15	23	22	8	7	19	7	9	6	22	4	17	22	23	21	13	0	5	14	22	317
H-	Anzahl Isolate						1	3		3	1		1	2		2		1						14	
	EPEC					9																			10
	STEC	1				1																			4
	ETEC		1	1		1													1						2
	DAEC	1	1																						
H+	Anzahl Isolate	13	13	13		8				6				10				5		13				81	
	STEC			2																	1			3	
Prävalenz gesamt (%)		6,3	6,1	8,6		32,3	4,5	37,5		12	14,3		16,7	6,3		11,8		7,7		7,7					

In der Kollektion hämolytischer *E. coli* wurde in drei Isolaten (3,7%) jeweils das inVAG *stx2e* detektiert. Zwei Isolate entstammten gesunden Hausschweinen, ein weiteres Isolat einer Stockente (Tab. 20). Die 13 weiteren inVAGs (*fanA*, *fedA*, *fasA*, *faeG*, *fimF41a*, *ipaH*, *eltB1p*, *aggR*, *daaD*, *eaеA*, *est1*, *est2*, *stx1*) wurden in keinem der hämolytischen Isolate nachgewiesen.

Insgesamt wurden inVAGs am häufigsten in *E. coli*-Isolaten aus Rehen (32,3%, 10 von 31 Isolaten) und Feldhasen (37,5%, 3 von 8 Isolaten) detektiert. Isolate aus kranken Hausschweinen enthielten keine inVAGs.

5.2.4 Vergleich hämolytischer und nicht hämolytischer *Escherichia coli*-Isolate

VAGs. Die Anzahl der mittels MPMA nachgewiesenen VAGs unterschied sich in Abhängigkeit der Fähigkeit zur Hämolyse eines *E. coli*-Stammes signifikant ($p < 0,05$). Hämolytische *E. coli*-Isolate mit einer durchschnittlichen Anzahl von $18 \pm 4,5$ nachgewiesenen VAGs enthielten mehr als das Doppelte an VAGs im Vergleich zu nicht hämolytischen Isolaten mit durchschnittlich $8 \pm 4,18$ nachgewiesenen VAGs pro Isolat. Die Prävalenz der Toxingene *cnf1/2* und *vat* ($p < 0,01$) sowie der Adhäsingene *hra*, *mat*, *papC*, *sfa/foc* ($p < 0,01$) und *fimC* ($p < 0,05$) war in hämolytischen Isolaten signifikant höher als in nicht hämolytischen Isolaten. Ein ebenfalls signifikanter Unterschied bestand in der Prävalenz der Siderophore *chuA*, *fyuA*, *iroN*, *irp2*, *sitC* und *ireA* sowie der Gene *malX* und *pic* ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu wurden die exVAGs *sitep*, *astA* und *tia* häufiger in nicht hämolytischen Isolaten nachgewiesen ($p < 0,05$). Letztlich wurden in hämolytischen Isolaten signifikant mehr exVAGs für Adhäsine, Toxine und Siderophore nachgewiesen ($p < 0,01$) (Tab. 21). Nicht hämolytische Isolate enthielten allerdings mehr inVAGs (6 inVAGs) als hämolytische Isolate (1 inVAG) (Tab. 18).

Tab. 21: Prävalenz der Virulenzfaktorgruppen (%) in hämolytischen und nicht hämolytischen *E. coli*-Isolaten.
*signifikant höhere Prävalenz nach Fisher's-exact-Test $p < 0,01$.

VAGs	Virulenzfaktorgruppe	nicht hämolytische Isolate	hämolytische Isolate
exVAGs	Adhäsine	39,6	77,3*
	Invasine	15,8	23,9
	Toxine	9,8	54,0*
	Protektine	41,8	42,6
	Siderophore	21,6	52,0*
	Sonstige	16,2	57,3*
inVAGs	gesamt	1,6	0,5

Phylogenie. In der Kollektion der nicht hämolytischen *E. coli*-Isolate wurde kein signifikanter Unterschied der Zugehörigkeit der Isolate zu den vier phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D nachgewiesen. Anders verhielt es sich mit den Isolaten der hämolytischen *E. coli*. Diese gehörten zu 83% zur phylogenetischen Gruppe B2 ($p < 0,05$). Isolate der phylogenetischen Gruppen B1 und A waren jeweils mit unter 11% deutlich unterrepräsentiert. Keines der hämolytischen Isolate gehörte zur phylogenetischen Gruppe D.

5.3 Adhäsionsassay

5.3.1 Prinzip des Adhäsionsassays

Zellbiologische Untersuchungen, beispielsweise zur Analyse der Interaktion zwischen Bakterien und Zellen oder Geweben (Adhäsions-, Infektions- und Invasionsstudien) werden häufig mit Lyseassays durchgeführt (Lee und Falkow 1990; Schierack *et al.* 2011). Hierbei wird die Anzahl der adhärenenten bzw. invasiven Bakterien im Anschluss an die Inkubation mit Wirtszellen nach Lysis dieser Zellen und nachfolgendem Ausplattieren in mehreren Verdünnungsstufen auf Nähragar durch Auszählen der gewachsenen Kolonien bestimmt. Um diese zeitaufwändige Vorgehensweise zu umgehen, wurden innerhalb dieser Arbeit Adhäsionsassays entwickelt, die ohne Lyse der Zellen die Detektion der Bakterien ermöglichten (Abb. 9)(Frömmel *et al.* 2013a; Frömmel *et al.* 2013b).

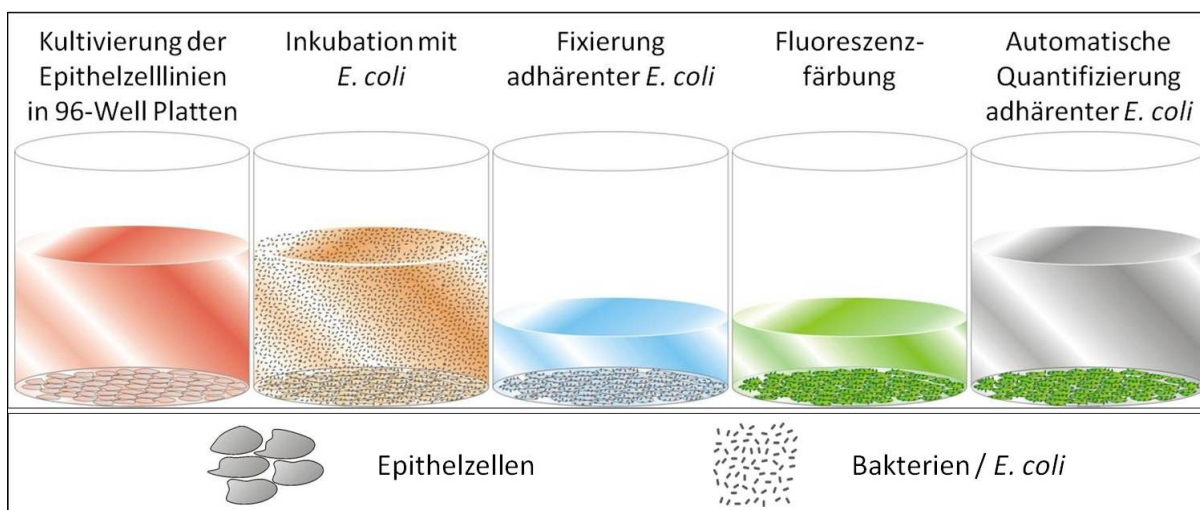


Abb. 9: Schematische Darstellung des Adhäsionsassays. Nach der Ausbildung konfluenter Monolayer der in 96-Well-Platten kultivierten Epithelzelllinien wurden diese mit *E. coli* inokuliert und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen. Die Monolayer mit den adhärenenten *E. coli* wurden mit 1xPBS gewaschen, mit 4% PFA fixiert und mit PI gefärbt. Die Quantifizierung adhärenenter fluoreszenzgefärbter *E. coli* erfolgte mittels VideoScan.

5.3.2 Fixierung und Fluoreszenzfärbung

Es wurden Fluoreszenzfärbetechniken etabliert, um eine automatische bildbasierte Auswertung mit der VideoScan-Technologie zu ermöglichen. Die VideoScan-Technologie wurde für die Detektion und Quantifikation von an Epithelzellen adhärenierenden Bakterien adaptiert (Abs. 4.5.2.6). Für die Etablierung des Adhäsionsassayprotokolls wurde die Verwendung der Fixierungsreagenz Paraformaldehyd (PFA) und der Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (PI) und DAPI getestet. Nach der Fixierung der Zellmonolayer mit 4% PFA in 1xPBS und anschließender Färbung mit PI (Abs. 4.4.4) zeigten sich in den Bildern fluoreszente und nicht fluoreszente Bereiche. Es musste abgeklärt werden, ob es sich bei den nicht fluoreszenten Bereichen um nicht gefärbte Zellen oder defekte Monolayer (keine Epithelzellen vorhanden) handelte. Aus diesem Grund wurden mittels Fluoreszenz-

und Phasenkontrast- (PhaKo) Mikroskopie Bilder der Monolayer der Zelllinien Caco-2, IPEC-J2 und 5637 aufgenommen (Abb. 10:1-3). Da PI nur in tote Zellen eindringen kann, konnte anhand der Aufnahmen der konfluenten Monolayer mittels PhaKo gezeigt werden, dass während der Fixierung mit 4% PFA in 1xPBS nicht alle Zellen abgetötet wurden.

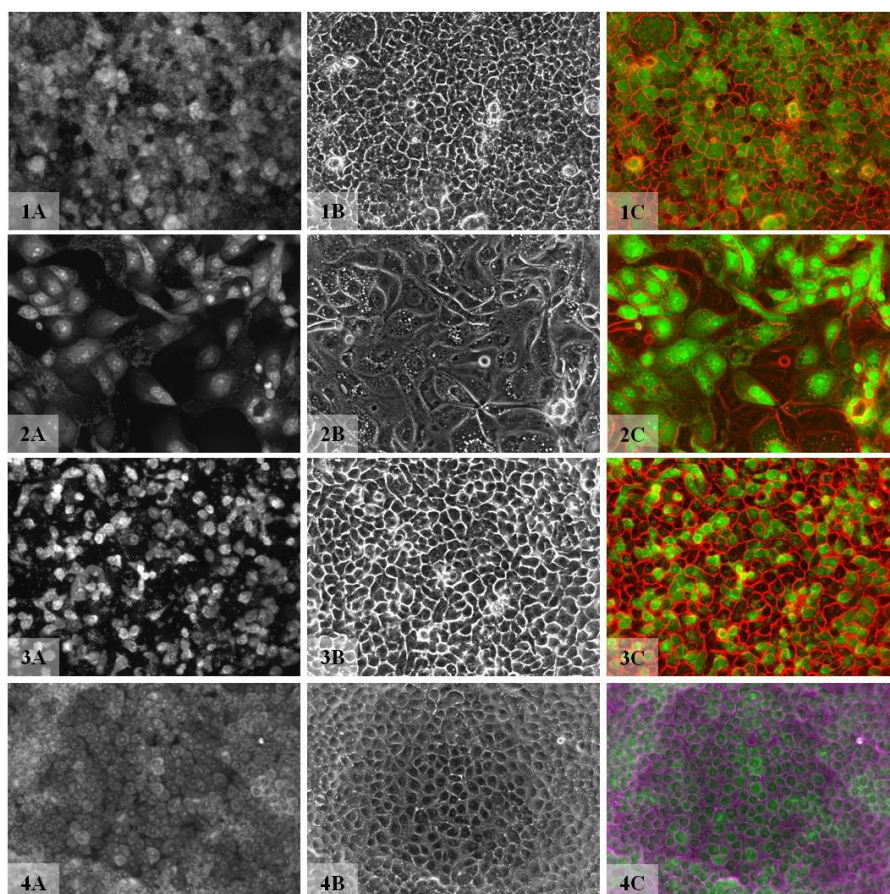


Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien Caco-2 (1), IPEC-J2 (2), 5637 (3) und PK-15 (4). 1-3A: Fixierung mit 4% PFA in 1xPBS, Färbung mit Propidiumiodid (PI), 4A: Fixierung mit 4% PFA in ddH₂O, Färbung mit PI, B: Phasenkontrastaufnahme, C: Überlagerung der beiden Aufnahmen. Grün: PI, rot: PhaKo.

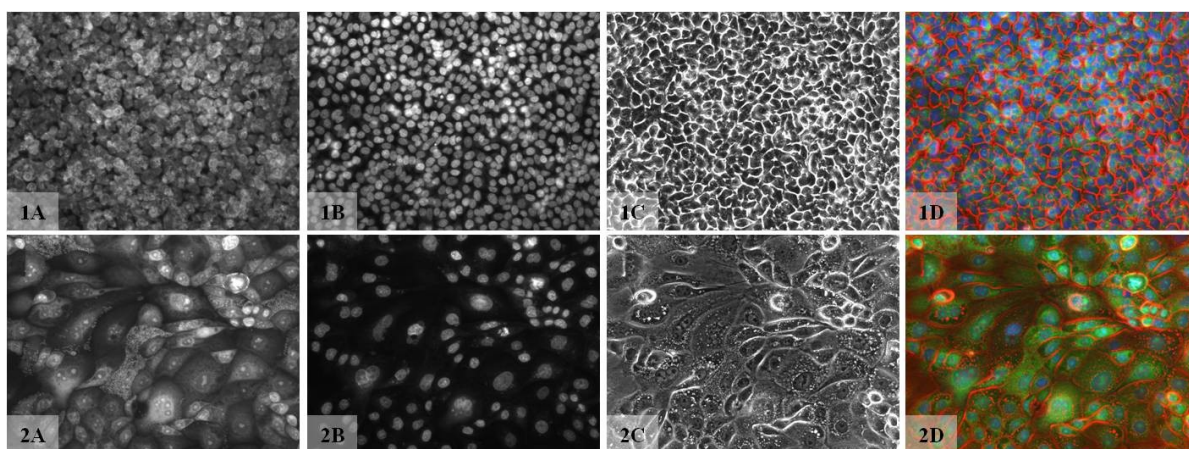


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien 5637 (1) und IPEC-J2 (2). Fixierung mit 4% PFA in ddH₂O, Färbung: erst PI, danach DAPI, C: PhaKo, D: Überlagerung der Aufnahmen. Grün: PI, blau: DAPI, rot: PhaKo.

Die Fixierung wurde daraufhin mit 4% PFA in ddH₂O getestet und ist für die Zelllinien PK-15 (Abb. 10: 4), 5637 und IPEC-J2 (Abb. 11) dargestellt. Mit PFA in ddH₂O wurden alle Zellen abgetötet. Die Färbung mit PI verdeutlicht im Vergleich zur DAPI-Färbung, dass PI neben Nukleinsäuren Bestandteile des Cytoplasmas anfärbt (Abb 11). In Abb. 12 ist die Detektion adhärenter *E. coli* auf IPEC-J2 Zellen an einem Beispiel dargestellt.

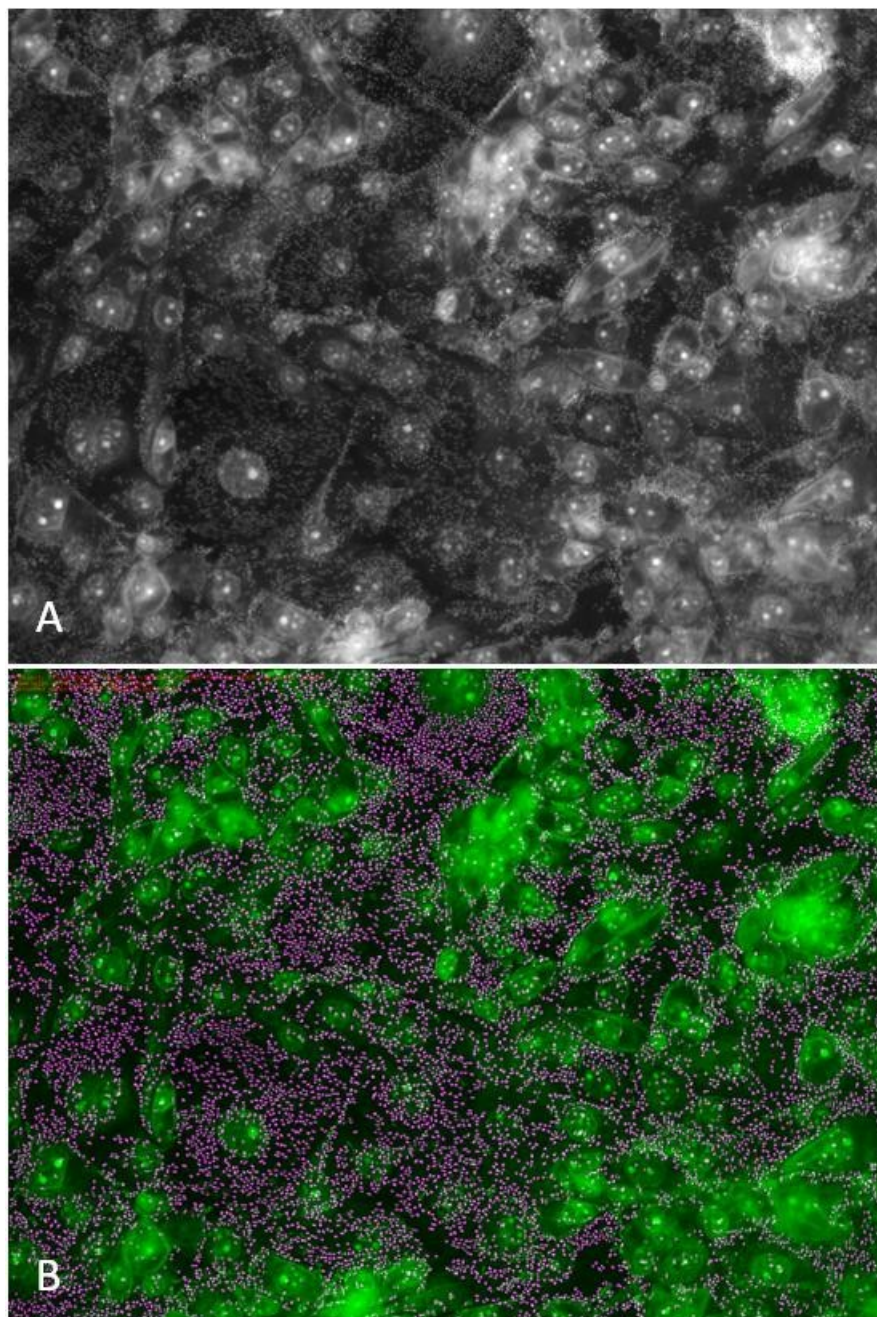


Abb. 12: Detektion adhärenter *E. coli* auf IPEC-J2-Zellen. A) Aufnahme der fluoreszenzgefärbten Zellen und Bakterien. B) Die Software des VideoScan-Systems identifiziert automatisch die Epithelzellen (grün) und quantifiziert adhärenente Bakterien (pink) mit Hilfe eines dafür entwickelten Bildverarbeitungsalgorithmus.

5.4 Adhäsion von *Escherichia coli* auf eukaryotischen Zellen

5.4.1 Adhäsion nicht hämolytischer *Escherichia coli* an Epithelzellen

Hämolytische *E. coli* zerstören Zellen. Aus diesem Grund wurden nur die Adhäsionseigenschaften der 317 nicht hämolytischen Isolate untersucht (Frömmel *et al.* 2013a; Frömmel *et al.* 2013b). Die Adhäsionseigenschaften der *E. coli*-Isolate variierten erheblich. Die Adhäsionsrate der einzelnen Isolate lag zwischen null und 64.766 Bakterien/mm². Die mit Abstand höchste Adhäsionsrate zeigte ein Isolat aus einem Reh (auf IPEC-J2: 64.766 Bakterien/mm², PK-15: 58.031, Caco-2: 40.473, 5637: 37.966). Insgesamt adhärten 209 Isolate (66%) an mindestens einer Zelllinie, 108 (34%) Isolate waren nicht adhären (<1.000 Bakterien/mm², Abs. 4.4.4). Die meisten Isolate adhärten auf Caco-2 (n=156, 49%), gefolgt von IPEC-J2 (n=109, 34%), 5637 (n=93, 29%) und PK-15 (n=77, 24%) (Abb. 13). Die Isolate adhärten zelllinienspezifisch (Caco-2: 12%; IPEC-J2: 7%; 5637: 4%; PK-15: 1%), gewebespezifisch (intestinale Epithelzelllinien: 7%; Uro-Epithelzelllinien: 0,3%) und wirtsspezifisch (humane Epithelzelllinien: 6%; porcine Epithelzelllinien: 2%). 27% der Isolate (n=85) adhärten jedoch unspezifisch, d.h. jeweils an allen Zelllinien oder auf mehreren Zelllinien, die keiner der anderen Gruppen entsprachen (Abb. 14)(Frömmel *et al.* 2013b).

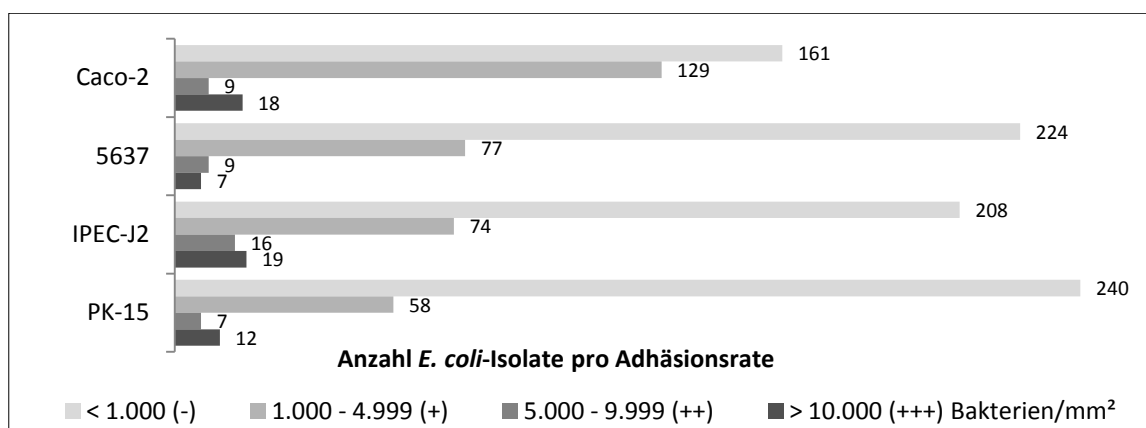


Abb. 13: Anzahl der jeweils nicht (-), schwach (+), mittel (++) und stark (+++) adhärenen *E. coli*-Isolate auf vier Zelllinien. Die Epithelzelllinien Caco-2, 5637, IPEC-J2 und PK-15 wurden mit *E. coli*-Isolaten über 4 h inkubiert. Nach Entfernen nicht adhärenter Bakterien durch mehrmaliges Waschen der Zellen erfolgte die automatische Detektion und Quantifizierung adhärenter Bakterien mittels VideoScan.

48% der Isolate (n=151) waren ausschließlich schwach, 1% der Isolate (n=4) ausschließlich mittel und 3% der Isolate (n=8) ausschließlich stark adhären an mindestens einer Zelllinie. Beispielsweise adhärte ein Isolat aus einem Feldhasen stark an Caco-2- (21.689 Bakterien/mm²), IPEC-J2- (23.036 Bakterien/mm²) und PK-15-Zellen (10.116 Bakterien/mm²), es adhärte jedoch nicht an 5637-Zellen. Ein Isolat eines Menschen mit UTI adhärte an IPEC-J2-Zellen stark (21.060 Bakterien/mm²), jedoch nicht an Caco-2-, 5637- und PK-15-Zellen. Mit jeweils unterschiedlichen Adhäsionsraten (schwach, mittel oder stark) auf mindestens zwei der vier Zelllinien adhärten 15%

der Isolate (n=47). Beispielsweise adhärierte ein intestinales Isolat eines Hausschweins schwach an PK-15- (3.681 Bakterien/mm²), mittel an Caco-2- (7.670 Bakterien/mm²), stark an IPEC-J2-Zellen (19.321 Bakterien/m²), jedoch nicht an 5637-Zellen. Insgesamt adhärierten 36 (11,4%) Isolate auf mindestens einer Zelllinie stark. Jeweils ein Isolat aus einem Reh und einem Eichhörnchen adhärierte stark auf allen Zelllinien. Generell war festzustellen, dass die Adhäsionsfähigkeit der Isolate auf humanen sowie auch auf intestinalen Epithelzelllinien deutlich stärker ausgeprägt war.

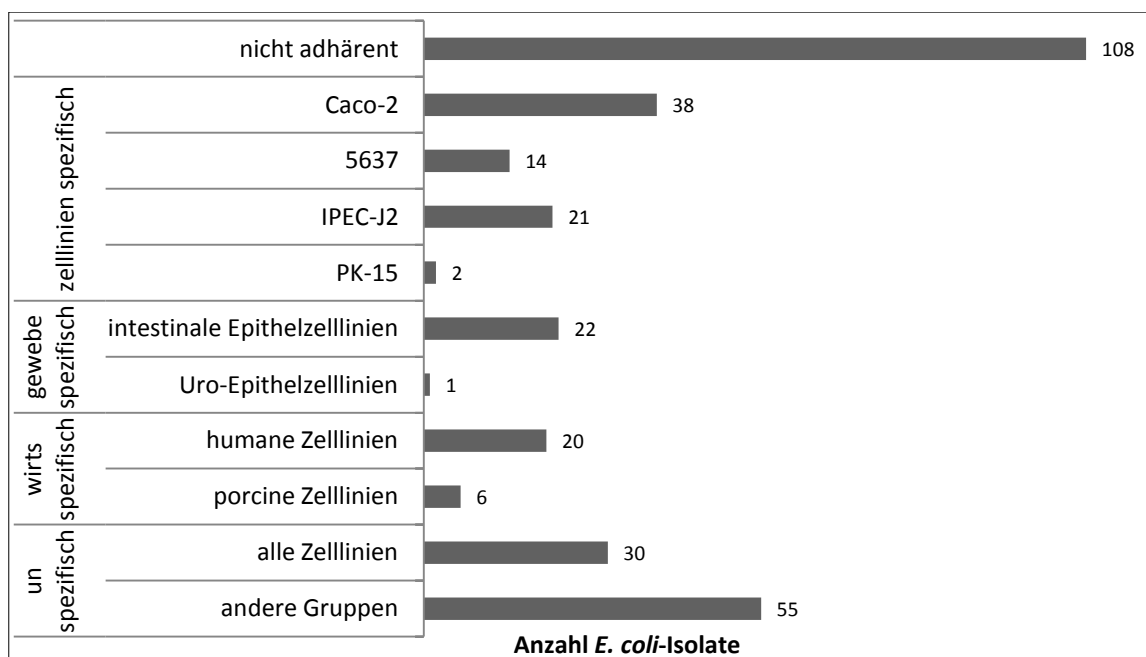


Abb. 14: Anzahl der zelllinien-, gewebe-, wirts- und unspezifisch adhärenen *E. coli*-Isolate. Die meisten Isolate (n=108) adhärierten auf keiner Zelllinie. „Andere Gruppen“: Die Isolate adhärierten auf mehreren Zelllinien, die keiner der anderen Gruppen entsprachen: 1) Caco-2, 5637, IPEC-J2; 2) Caco-2, 5637, PK-15; 3) Caco-2, IPEC-J2, PK-15; 4) 5637, IPEC-J2, PK-15; 5) Caco-2, PK-15; 6) 5637, IPEC-J2.

***E. coli* aus Menschen.** Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Adhäsion von intestinalen Isolaten und Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Menschen auf humanen Zelllinien ermittelt. Vier der 20 Isolate aus Menschen mit UTI (20%) waren jeweils auf mindestens einer der Zelllinien stark adhärenent. Nach Ausschluss nicht adhärenenter Isolate zeigte sich, dass die Isolate aus dem Urin harnwegserkrankter Menschen besser an Uro-Epithelzelllinien adhärenerten als intestinale Isolate des Menschen ($p < 0,05$).

***E. coli* aus Hausschweinen.** Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Adhäsion von intestinalen Isolaten und Isolaten aus dem Urin harnwegserkrankter Hausschweine auf porcinen Zelllinien ermittelt. Die meisten stark adhärenenten Isolate wurden aus dem Urin harnwegserkrankter Hausschweine (4 von 15 Isolaten, 27%) isoliert.

***E. coli* aus Wildtieren.** In Eichhörnchen wurde mit 16 von 17 Isolaten (94%) der höchste Anteil adhärenenter Isolate innerhalb einer Art nachgewiesen (Abb. 15). Diese Isolate adhärenerten ver-

stärkt auf porcinen Zelllinien, wobei drei dieser Isolate (18%) stark adhären waren. Isolate aus Hausmäusen und Wildschweinen wiesen den jeweils niedrigsten Anteil adhärenter Isolate auf (Abb. 15). Generell waren die Isolate aus Wildsäugern weniger adhären als die Isolate aus Vögeln ($p < 0,05$). Die Isolate aus Amseln adhärten stark auf den intestinalen Zelllinien ($p < 0,05$), wobei vier der 22 Isolate (18%) stark adhären auf mindestens einer der Zelllinien waren.

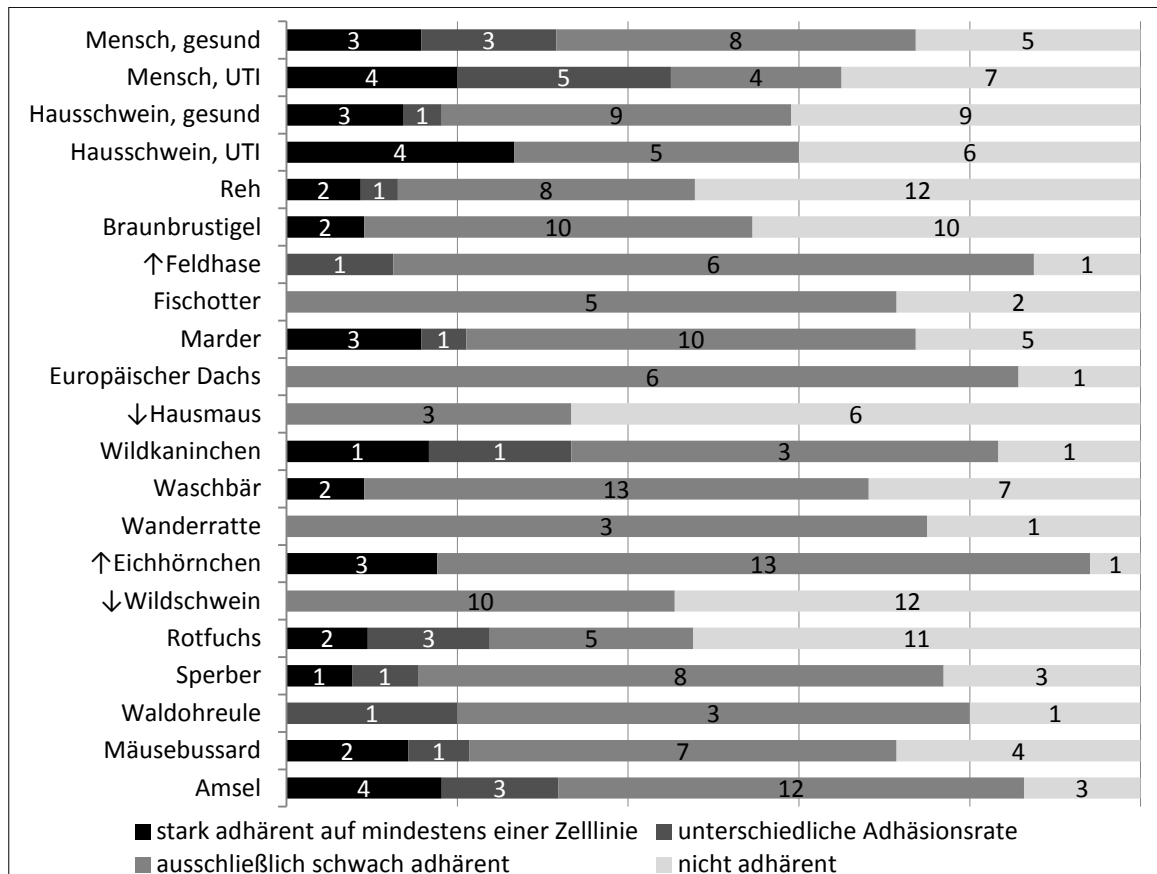


Abb. 15: Wertspezifisches Adhäsionsverhalten der *E. coli*-Isolate. Die entsprechende Anzahl der Isolate ist als Zahl in den Balken eingefügt. Pfeile: Isolate der entsprechenden Art mit der jeweils höchsten (↑) und niedrigsten (↓) Anzahl adhärenter Bakterien/mm². Unterschiedliche Adhäsionsrate: Isolate adhärten auf mindestens zwei der Zelllinien unterschiedlich stark (schwach, mittel oder stark).

5.4.2 Assoziation zwischen VAGs, Phylogenie und Adhäsion von *Escherichia coli*

VAGs. Um eine Assoziation zwischen VAGs und Adhäsion der *E. coli* auf einer Zelllinie zu ermitteln, wurde die Adhäsionsrate (Median) der jeweils für ein VAG positiven und der für dieses VAG negativen Isolate verglichen. Es wurden folgende Kriterien gesetzt: 1) Die Anzahl adhärenter Bakterien musste höher als der Betrag des Hintergrundes mit einem Bakterium pro Epithelzelle, d.h. entsprechend des Leerwertes (1.000 Bakterien/mm²) sein. 2) Die Adhäsionsrate VAG-positiver *E. coli*-Isolate musste sich signifikant von der Adhäsionsrate VAG-negativer *E. coli*-Isolate unterscheiden (Frömmel *et al.* 2013b).

Auf Caco-2-Zellen adhärirten Isolate mit den VAGs *afa/dra/daaD*, *tsh*, *vat*, *ibeA*, *fyuA* und *mat* ($p < 0,01$) sowie *malX*, *pic* und *irp2* ($p < 0,05$) mit erhöhter Adhäsionsrate. Auf 5637-Zellen adhärirten Isolate mit den VAGs *afa/dra/daaD* ($p < 0,01$) mit erhöhter Adhäsionsrate. Auf IPEC-J2-Zellen adhärirten Isolate mit den VAGs *sfa/foc* und *vat* ($p < 0,01$) sowie *papC* ($p < 0,05$) mit erhöhter Adhäsionsrate.

Phylogenie. Generell adhärirten B2-Stämme signifikant stärker als A-, B1- und D-Stämme ($p < 0,05$). Die Adhäsionsrate der Isolate in Abhängigkeit deren Phylogenie ist in Tab. 22 zusammengefasst. Die höchste durchschnittliche Adhäsionsrate wurde für B2-Stämme auf IPEC-J2-, gefolgt von Caco-2-Zellen detektiert. Die niedrigste Adhäsionsrate wurde für D-Stämme auf PK-15-Zellen und B1-Stämmen auf 5637-Zellen detektiert.

Tab. 22: Adhäsionsrate der nicht hämolytischen *E. coli*-Isolate in Abhängigkeit deren Phylogenie auf vier Zelllinien (alle: Mittelwert // Median der Anzahl an Bakterien/mm² aller Isolate der entsprechenden phylogenetischen Gruppe; >1.000: Mittelwert // Median der Anzahl an Bakterien/mm² der Isolate der entsprechenden phylogenetischen Gruppe mit >1.000 adhärenen Bakterien/mm²).

Phylogenie	Caco-2		5637	
	alle Mittelwert // Median	>1.000 Mittelwert // Median	alle Mittelwert // Median	>1.000 Mittelwert // Median
A	1.710 // 613	4.212 // 2.791	1.680 // 508	4.468 // 2.189
B1	2.899 // 1.107	5.105 // 1.840	957 // 437	3.037 // 1.932
B2	4.811 // 1.329	7.935 // 2.322	2.144 // 744	4.445 // 1.819
D	1.610 // 791	3.078 // 1.797	1.290 // 518	3.656 // 1.904
	IPEC-J2		PK-15	
A	1.707 // 480	4.584 // 2.430	1.707 // 480	4.584 // 2.430
B1	2.214 // 570	6.364 // 3.157	2.214 // 570	6.364 // 3.157
B2	5.671 // 1.058	10.454 // 4.595	5.671 // 1.058	10.454 // 4.595
D	1.237 // 535	3.533 // 2.266	1.237 // 535	3.533 // 2.266

5.4.3 Adhäsionsmuster von *Escherichia coli*

Nach visueller Inspektion von ca. 150.000 Bildern wurden vier verschiedene Adhäsionsmuster differenziert (Abb. 16): A) diffus verteilte einzelne Bakterien, B) Mikrokolonien (separierte Aggregationen mit mindestens fünf Bakterien), C) Ketten (mindestens fünf Bakterien) und D) Agglomerate tausender Bakterien (Frömmel *et al.* 2013a). Es wurden Isolate mit zelllinien-, gewebe- und wirtsspezifischer Ausbildung von Adhäsionsmustern detektiert (Tab. 23). Es wurden auch Isolate detektiert, welche Adhäsionsmuster auf allen Zelllinien oder auf Zelllinien, die keiner der anderen Zellliniengruppen entsprachen, bildeten (unspezifisch)(Tab. 23).

Die meisten Isolate ($n=191$, 60%) adhärirten mit einem bestimmten Adhäsionsmuster, entweder diffus verteilt ($n=127$, 40%), Mikrokolonien ($n=58$, 18%) oder Ketten bildend ($n=6$, 2%), auf mindestens einer Zelllinie (Tab. 23). 25 Isolate (8%) bildeten unterschiedliche Adhäsionsmuster auf

den einzelnen Zelllinien (Tab. 23 Spalte „Verschiedene Muster“). 90 von 127 diffus verteilt adhären- ten Isolaten (71%) bildeten dieses Adhäsionsmuster zelllinien-, gewebe- und wirtsspezifisch (Tab. 23). Diffuse Adhäsion war demnach zu 71% spezifisch. Die Hälfte der Mikrokolonien bildenden Isolate (n=29) adhärten zelllinien-, gewebe- oder wirtsspezifisch (Tab. 23). Mikrokoloniebildung war demnach zu 50% spezifisch. Jeweils ein Isolat aus einem Menschen und einem Eichhörnchen bildete Agglomerate auf der Zelllinie 5637 (Abb. 16D). Auf den anderen Zelllinien adhärten diese Isolate diffus verteilt, bzw. bildeten Mikrokolonien. Spezifische Adhäsionsmuster der Isolate von Menschen auf humanen und von Schweinen auf porcinen Zelllinien konnten nicht detektiert werden. Die Isolate zeigten unterschiedliche Adhäsionseigenschaften auf den vier Zelllinien (Tab. 24).

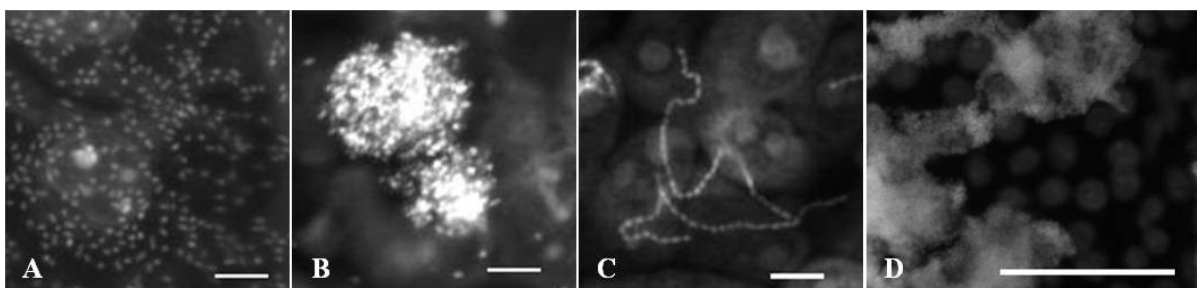


Abb. 16: Adhäsionsmuster der *E. coli*-Isolate. Fluoreszenzbilder der Epithelzelllinien mit adhären- ten Bakterien, gefärbt mit PI. **A)** Ein Isolat eines Hausschweins adhärte diffus verteilt auf IPEC-J2-Zellen. **B)** Ein Isolat eines Wildhasen bildete Mikrokolonien auf Caco-2-Zellen. **C)** Ein Isolat eines Wildschweins bildete Ketten auf PK-15-Zellen. **D)** Ein Isolat eines Menschen bildete Agglomerate auf 5637-Zellen. Maßstab **A-C:** 10 µm, **D:** 100 µm.

Tab. 23: Zelllinien-, gewebe-, wirts- und unspezifische Adhäsionsmusterbildung der *E. coli*-Isolate. Die Isolate adhärten diffus verteilt (n=127), bildeten Mikrokolonien (n=58), Ketten (n=6) oder adhärten mit unterschiedlichen Mustern auf mehreren Zelllinien (Verschiedene Muster, n=25). Andere Verteilung: Die Isolate adhärten auf mehreren Zelllinien, die keiner der anderen Gruppen entsprachen: 1) Caco-2, 5637, IPEC-J2; 2) Caco-2, 5637, PK-15; 3) Caco-2, IPEC-J2, PK-15; 4) 5637, IPEC-J2, PK-15; 5) Caco-2, PK-15; 6) 5637, IPEC-J2.

Spezifität	Zelllinien	Diffus verteilt	Mikro-Kolonien	Ketten	Verschiedene Muster
Zelllinie	Caco-2	31	6	1	
	5637	11			
	IPEC-J2	17	3		
	PK-15	2			
Gewebe	Intestinales Epithel (Caco-2, IPEC-J2)	16	9		1
	Uro-Epithel (5637, PK-15)	1			
Wirt	Human (Caco-2, 5637)	9	8		1
	Porcin (IPEC-J2, PK-15)	3	3		
unspezifisch	Alle Zelllinien	10	21	3	12
	Andere Verteilung	27	8	2	11

Elf Isolate waren zu wirts- und gewebeunspezifischer Kettenbildung in der Lage. Zur genaueren Untersuchung dieses Adhäsionsmusters wurde analysiert, ob dieses Phänomen durch die Epithelzellen induziert wurde. Es wurde untersucht, ob die Kettenbildung nach Inkubation in i) LB-Medium, ii) Zellkulturmedium, iii) während der Inkubation mit Zellen in Zellkulturmedium oder iv) mit Zellen in LB-Medium auftrat. Die Ergebnisse sind beispielhaft für ein Isolat aus einer Amsel in Abb. 17 dargestellt. Während der Inkubation der Isolate über Nacht in LB-Medium erfolgte keine

Kettenbildung. Nach darauf folgender Inkubation über vier Stunden bei 37 °C in drei Zellkulturmedien (Tab. 9) wurden Ketten sichtbar. Nach Inkubation der Bakterien über vier Stunden auf Epithelzelllinien sowohl in Zellkulturmedium als auch in LB-Medium wurde wiederum Kettenbildung beobachtet (Frömmel *et al.* 2013a).

Tab. 24: Adhäsionsmusterbildung von *E. coli* nach Wirtsarten unterteilt.

Zelllinie	Art	Mensch, intestinal	Mensch, UTI	Hausschwein, intestinal	Hausschwein, UTI	Reh	Braunbrustigel	Feldhase	Fischotter	Marder	Dachs	Hausmaus	Wildkaninchen	Waschbär	Wanderratte	Eichhörnchen	Wildschwein	Rotfuchs	Sperber	Waldohreule	Mäusebussard	Amsel	Summe	
		Anzahl Isolate	19	20	22	15	23	22	8	7	19	7	9	6	22	4	17	22	21	13	5	14	22	317
Caco-2	Mikrokolonien	6		4	1	3	6	5		6	2		1	6	2	8	1	4				2	8	65
	Ketten					2				3								2				1	1	9
	Agglomerate																							0
	Diffus verteilt	4	7	5	5	5	1	3	5	2	4	3	4	8	1	8	1	3	8	3	7	8	8	95
	Nicht adhären	9	13	13	9	13	15		2	8	1	6	1	8	1	1	18	14	5	2	4	5	5	148
5637	Mikrokolonien	2	2	2	1	4	4	1		5	1		1	4	2	4	1	3				1	4	42
	Ketten					1				1							2					2	6	2
	Agglomerate	1														1							2	2
	Diffus verteilt	5	5	5	2	2	2	2	2	3				3		3	5	4	2	1	2	2	2	50
	Nicht adhären	11	13	15	12	16	16	5	5	10	6	9	5	15	2	9	14	14	11	4	11	14	14	217
IPEC-J2	Mikrokolonien	3	2	3	2	2	6	3		7	2		2	2	2	5		6	1		1	7	56	
	Ketten						1										2				1	1	5	
	Agglomerate																						0	
	Diffus verteilt	7	6	4	4	3	5		2	7	2	3	1	1		3	1		3	1	3	9	65	
	Nicht adhären	9	12	15	9	18	10	5	5	5	3	6	3	19	2	9	19	15	9	4	9	5	5	191
PK-15	Mikrokolonien	6		2	1	3	2	2		4	1		2	2	2	2		5				1	6	41
	Ketten					1				1							2					1	1	6
	Agglomerate																					1	1	0
	Diffus verteilt	2	5	3	4	1	1	1		3	1	1	2		1	3	1	4	3	1	5	1	1	43
	Nicht adhären	11	15	17	10	18	19	5	7	11	5	8	2	20	1	12	19	12	10	4	7	14	14	227

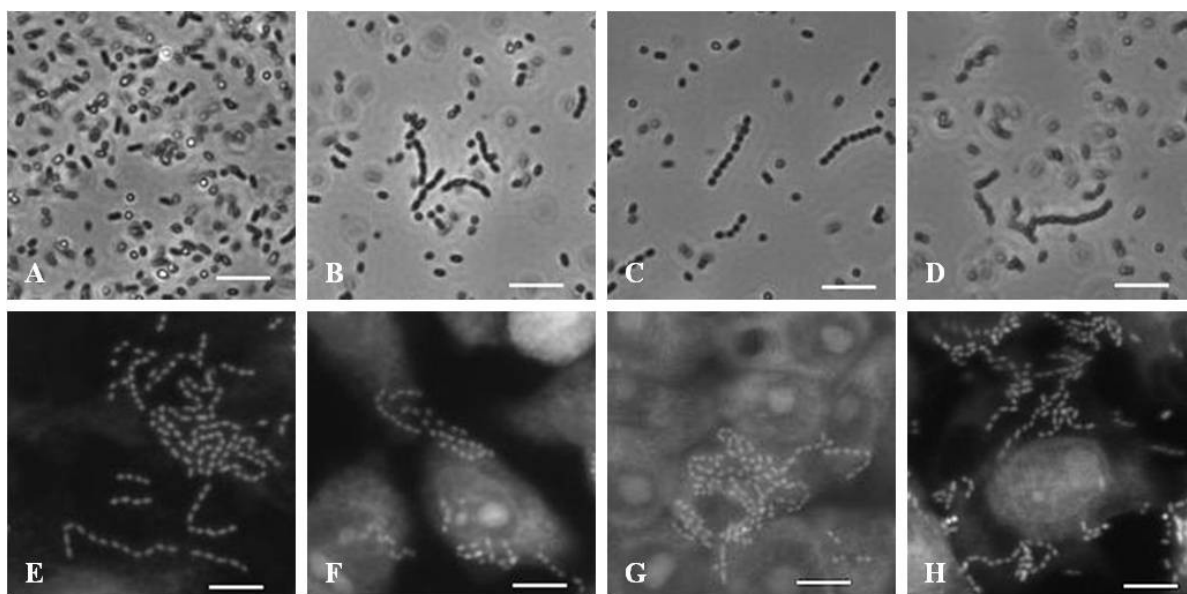


Abb. 17: Kettenbildung eines *E. coli*-Isolates einer Amsel. Isolat **A**) in LB-Medium nach Inkubation über Nacht; nach 4 h Inkubation in Zellkulturmedium für die Zelllinien **B**) Caco-2, **C**) 5637, **D**) IPEC-J2/PK-15; nach 4 h Inkubation in Zellkulturmedium auf den Zelllinien **E**) Caco-2, **F**) 5637, **G**) PK-15; **H**) nach 4 h Inkubation mit LB-Medium auf IPEC-J2-Zellen. **A-D**) Phasenkontrastmikroskopie. **E-H**) Fluoreszenzmikroskopie. Maßstab: 10 µm.

5.4.4 Assoziation zwischen *Escherichia coli*-Pathotypen und Adhäsionsmustern

In diesem Abschnitt beschriebene Ergebnisse wurden in Frömmel *et al.* 2013a zusammengefasst.

EPEC. Die für EPEC als typisch geltende Mikrokoloniebildung wurde auf den Epithelzellen des Intestinal- und Urinaltraktes sowie auf der Modellzelllinie HEp-2 mit den als EPEC (*eaeA*⁺) klassifizierten Isolaten untersucht (Abs. 4.4.5). Alle 14 *eaeA*⁺ Isolate bildeten jeweils Mikrokolonien auf mindestens zwei Epithelzelllinien. Keines der Isolate bildete Mikrokolonien auf allen Zelllinien. Mit dem Nachweis des pEAF wurden zwei der 14 EPEC als tEPEC klassifiziert. Der tEPEC aus einem Braunbrustigel bildete Mikrokolonien auf den Zelllinien 5637 und IPEC-J2 (Abb. 18), zerstörte allerdings die Zellmonolayer der anderen Zelllinien innerhalb vier Stunden Inkubation. Innerhalb sechs Stunden Inkubation wurden auch die Monolayer der 5637- und HEp-2-Zellen zerstört. IPEC-J2-Zellen blieben jedoch konfluent. Der zweite tEPEC aus einem Wildkaninchen bildete innerhalb vier Stunden lediglich auf PK-15-Zellen Mikrokolonien, während er auf den anderen Zelllinien nicht adhärierte. Innerhalb sechs Stunden Inkubation bildete dieses Isolat Mikrokolonien auf den Zelllinien IPEC-J2, PK-15 und HEp-2, jedoch nicht auf Caco-2- und 5637-Zellen. Die aEPEC-Isolate wiesen mit einer Ausnahme keine Veränderung der Musterbildung über die Zeit auf. Das aEPEC-Isolat aus einem Rotfuchs adhärierte innerhalb vier Stunden Inkubation nicht, bildete jedoch innerhalb sechs Stunden Inkubation Mikrokolonien auf PK-15-Zellen. Die meisten EPEC bildeten dieses Adhäsionsmuster auf IPEC-J2-Zellen (Abb. 18).

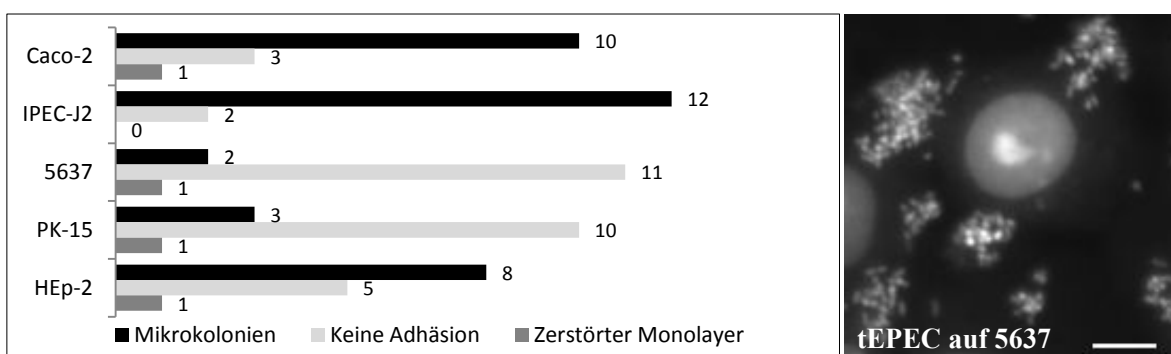


Abb. 18: Links: Adhäsionsmuster von vierzehn *eaeA*⁺ *E. coli*-Isolaten auf fünf Zelllinien nach 6 h Inkubation. Mikrokolonien wurden gebildet: Auf Caco-2 von 10 aEPEC; auf IPEC-J2 von 10 aEPEC und 2 tEPEC; auf 5637 von 2 aEPEC; auf PK-15 von 2 aEPEC und 1 tEPEC; auf HEp-2 von 7 aEPEC und 1 tEPEC. Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mikrokolonienbildenden tEPEC eines Igels auf 5637-Zellen. Maßstab: 10 µm.

STEC. Fünf der zehn als STEC klassifizierten Isolate adhärten sehr schwach auf Caco-2-Zellen. Ein weiterer STEC adhärte sehr schwach auf beiden humanen Zelllinien. Diese sechs Isolate adhärten diffus verteilt (n=3), bildeten Mikrokolonien (n=2) oder Ketten (n=1). Die Shigatoxin-Proteinexpression wurde mittels ELISA (Beutin *et al.* 2007) lediglich in drei Isolaten aus Rehen nach-

gewiesen. Eines dieser Isolate exprimiert Stx1, zwei dieser Isolate exprimierten sowohl Stx1 als auch Stx2. Ein Unterschied bezüglich der Adhäsionseigenschaften der shigatoxinexprimierenden und nicht exprimierenden Isolate konnte nicht detektiert werden. Generell waren die in dieser Studie isolierten nicht hämolytischen STEC nicht bis schwach adhärent ohne spezifisches Adhäsionsmuster.

ETEC. Von den vier als ETEC klassifizierten Isolaten war ein Isolat aus einem Rotfuchs (*est1*⁺) in der Lage, auf allen Zelllinien Mikrokolonien zu bilden. Zwei der ETEC, ein Isolat aus einem Reh (*est1*⁺) und ein weiteres Isolat aus dem Urin eines Patienten mit UTI (*est2*⁺), adhärten auf keiner der Zelllinien. Ein vierter ETEC wurde aus einem Hausschwein (*est2*⁺) isoliert. Dieser adhärte diffus verteilt lediglich auf 5637-Zellen. Für die isolierten ETEC konnte kein konsistentes Adhäsionsmuster nachgewiesen werden.

DAEC. Die zwei jeweils aus einem gesunden und einem harnwegserkrankten Menschen isolierten *daaD*⁺ DAEC bildeten das typische diffuse Adhäsionsmuster auf HEp-2-Zellen. Das Isolat aus einem gesunden Menschen adhärte zudem diffus auf den humanen Zelllinien. Das Isolat aus dem Urin eines Menschen mit UTI adhärte diffus auf den humanen und IPEC-J2-Zellen.

5.5 Zytotoxizitätsassay

5.5.1 Prinzip des Zytotoxizitätsassays

Das Prinzip des Zytotoxizitätsassays entspricht dem des Adhäsionsassays (Abs. 4.3). Jedoch wurden die Epithelzellen neben der Färbung mit PI für die Fokussierung durch die Software während der Messung zusätzlich mit DAPI gefärbt (Abs. 4.4.6). Die Detektion und Quantifizierung der Fläche der zerstörten Monolayer erfolgte mittels einer für diese Anwendung adaptierten AKLIDES[®]-Software. Die PI gefärbten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen (Abb. 19 jeweils A und C). Von diesen Aufnahmen wurden automatisch Kalkulationsbilder zur Bestimmung der Fläche des Monolayers erstellt (Abb. 19 jeweils B und D).

5.6 Zytotoxizität von *Escherichia coli*

5.6.1 Zytotoxizität hämolytischer *Escherichia coli* auf Epithelzellen

Zur Untersuchung der Zytotoxizität hämolytischer *E. coli* (Abs. 4.4.6) wurden die 81 Isolate aus sieben Tierarten mittels Zytotoxizitätsassay auf den Zelllinien LoVo, 5637, IPEC-J2 und PK-15 analysiert. Insgesamt waren 39 (48%) der Isolate in der Lage, durchschnittlich zwischen 75% und 100% der Monolayer aller Zelllinien zu zerstören. Die stärkste zytotoxische Wirkung wurde auf der Zelllinie LoVo (durchschnittlich 86% zerstörter Monolayer, $p < 0,0001$), gefolgt von IPEC-J2- (63,4%), 5637- (62,9%) und PK-15-Zellen (58,8%) detektiert. Im Gegensatz dazu waren sieben (8,6%) Isolate mit

durchschnittlich unter 11% zerstörtem Monolayer kaum zytotoxisch auf allen Zelllinien. Dies waren aus gesunden und harnwegserkrankten Menschen jeweils zwei Isolate, aus Hausschwein, Waschbär und Stockente je ein Isolat.

Um die Veränderung der Stärke der Zytotoxizität, d.h. der Zerstörung der Monolayer, während längerer Inkubationsdauer zu untersuchen, wurden jeweils zwei Messungen im Abstand von zwei Stunden durchgeführt (Tab. 25). Generell war auf allen Zelllinien ein Unterschied der Fläche des zerstörten Monolayers zwischen erstem und zweitem Messzeitpunkt ersichtlich. Dies ist beispielhaft für ein Isolat aus einem Hausschwein in Abb. 19 dargestellt. Die Zytotoxizität der Isolate änderte sich auf den Zelllinien LoVo, IPEC-J2 und PK-15 signifikant über die Zeit ($p < 0,0001$) (Tab. 25). Die Fläche des zerstörten Monolayers nahm besonders auf der Zelllinie PK-15 (54%) zu, gefolgt von den Zelllinien IPEC-J2 (49%), LoVo (16%) und 5637 (2%).

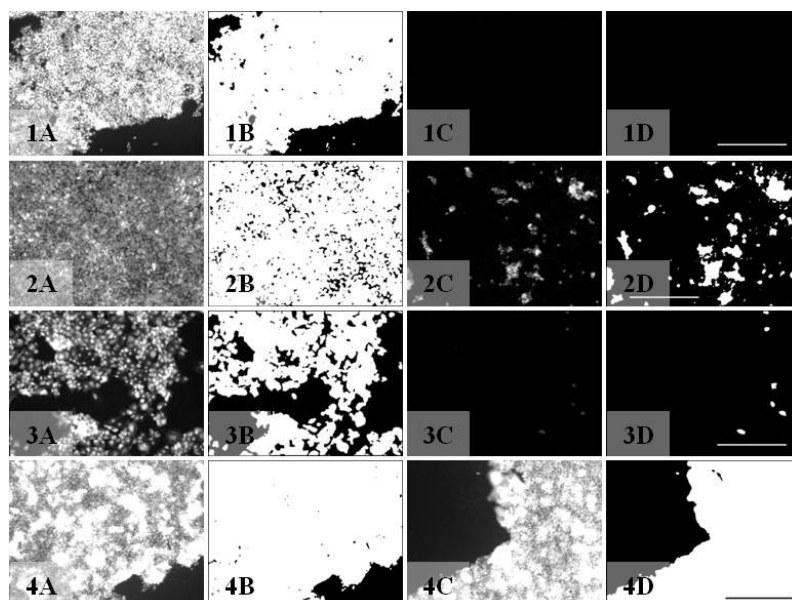


Abb. 19: Epithelzellen nach Inkubation mit einem hämolytischen *E. coli*-Isolat aus einem Hausschwein. Die Inkubation erfolgte auf den Zelllinien LoVo für 3 h (**1AB**: 29% zerstörter Monolayer) und 5 h (**1CD**: 100% zerstörter Monolayer), auf 5637 für 4 h (**2AB**: 0%) und 6 h (**2CD**: 64%), auf IPEC-J2 für 4 h (**3AB**: 21%) und 6 h (**3CD**: 99%) und PK-15 für 4 h (**4AB**: 8%) und 6 h (**4CD**: 68%). **A und C**: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen PI gefärbter Zellen, **B und D**: Kalkulationsbilder zur Bestimmung der Fläche des Monolayers. Maßstab: 100 μm .

***E. coli* aus Menschen.** Sowohl die Zytotoxizität der intestinalen Isolate aus Menschen ($p < 0,005$) als auch der Isolate aus Urin harnwegserkrankter Menschen ($p < 0,0001$) war stärker auf intestinalen als auf Uro-Epithelzelllinien. Die intestinalen Isolate zerstörten jedoch signifikant mehr Zellen als die Isolate aus Urin harnwegserkrankter Menschen ($p < 0,01$). Der Anteil des zerstörten Monolayers stieg nach Inkubation mit humanen intestinalen Isolaten auf den Zelllinien LoVo, IPEC-J2 und PK-15 zwischen erstem und zweiten Messzeitpunkt signifikant ($p < 0,001$), jedoch nicht auf 5637-Zellen. Der Anteil des zerstörten Monolayers nach Inkubation mit Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Menschen stieg auf allen Zelllinien signifikant ($p < 0,001$).

***E. coli* aus Hausschweinen.** Die Zytotoxizität der intestinalen Isolate aus Hausschweinen war stärker auf intestinalen als auf Uro-Epithelzelllinien ($p < 0,0001$). Der Fläche des zerstörten Monolayers nach Inkubation mit Isolaten aus Hausschweinen stieg auf allen Zelllinien signifikant ($p < 0,001$).

***E. coli* aus Wildtieren.** Die Zytotoxizität der Isolate aus Wildtieren war jeweils stärker auf intestinalen als auf Uro-Epithelzelllinien ($p < 0,01$) und zudem stärker auf humanen als auf porcinen Zelllinien ($p < 0,0001$). Isolate aus Wildtieren zerstörten im Gegensatz zu Isolaten aus Menschen (intestinal und UTI) und Hausschweinen durchschnittlich signifikant mehr Zellen ($p < 0,0001$). Der Anteil des zerstörten Monolayers nach Inkubation mit Isolaten aus Wildtieren war bereits zum ersten Messzeitpunkt auf humanen Zelllinien mit über 82,4% sehr stark und stieg innerhalb weiterer zwei Stunden der Inkubation um jeweils höchstens 0,4%. Im Gegensatz dazu stieg der Anteil zerstörten Monolayers der porcinen Zelllinien um mindestens 29,4% (Tab. 25).

Tab. 25: Zytotoxizität hämolytischer *E. coli* auf vier Zelllinien zu jeweils zwei Messzeitpunkten.

Art	Zelllinien	LoVo		5637		IPEC-J2		PK-15	
	Inkubationszeit	3h	5h	4h	6h	4h	6h	4h	6h
	Anzahl Isolate	zerstörter Monolayer (%)							
Mensch, intestinal	13	52,6	83,2	49,6	45,7	43,4	77,4	11,7	68,1
Mensch, UTI	13	28,8	88,2	14,4	31,2	31,5	77,2	0,3	63,0
Hausschwein, intestinal	13	67,9	94,9	22,6	40,7	47,5	83,0	26,5	76,1
Reh	8	99,7	100,0	82,4	78,2	38,1	99,9	53,6	100,0
Marder	6	99,8	100,0	88,6	83,9	41,4	99,1	36,3	99,6
Waschbär	10	85,7	86,1	83,8	83,9	52,9	90,1	60,6	90,0
Rotfuchs	5	99,7	100,0	87,1	85,5	25,1	85,1	18,4	99,8
Stockente	13	90,3	99,6	65,4	63,5	32,7	90,0	47,0	90,1
Zusammenfassung aller Isolate (MW)	81	78,1	94,0	61,7	64,1	39,1	87,7	31,8	85,9

Die Zytotoxizität der hämolytischen *E. coli* wurde sowohl auf intestinalen als auch auf Uro-Epithelzelllinien humanen und porcinen Ursprungs nachgewiesen. Grundsätzlich waren die Zellmonolayer nach längerer Inkubationszeit stärker geschädigt. Sehr starke Zytotoxizität zeigten die Isolate aus Wildtieren, wobei diese bereits zum ersten Messzeitpunkt auf humanen Zelllinien signifikant mehr Fläche zerstört hatten als Isolate aus Menschen und Hausschweinen ($p < 0,0005$). Isolate aus dem Urin harnwegserkrankter Menschen waren weniger zytotoxisch als humane intestinale Isolate ($p < 0,01$).

5.6.2 Assoziation zwischen VAGs, Phylogenie und Zytotoxizität von *Escherichia coli*

VAGs. Um eine Assoziation zwischen den VAGs und der Zytotoxizität der signifikant stärker zytotoxischen Isolate der Wildtiere ($p < 0,0001$) im Vergleich zu den Isolaten aus Menschen und aus Hausschweinen zu ermitteln, wurde die Prävalenz der VAGs mittels Fischer's-exact-Test verglichen. In den Isolaten aus Wildtieren wurden die exVAGs *mat*, *papC*, *fyuA*, *ireA* und *irp2* häufiger detektiert ($p < 0,05$) als in Isolaten aus Menschen und aus Hausschweinen.

Phylogenie. Die höchste Zytotoxizität wurde für B2-Stämme ermittelt (durchschnittlich 67% zerstörter Monolayer, $p < 0,001$), wobei diese jeweils signifikant stärker zytotoxisch auf humanen gegenüber porcinen sowie auf intestinalen gegenüber Uro-Epithelzelllinien ($p < 0,0001$) waren. Die Zelllinie LoVo war am anfälligsten ($p < 0,0001$). Der Anteil zerstörter Monolayers war jeweils zum zweiten Messzeitpunkt auf den Zelllinien LoVo, IPEC-J2 und PK-15 signifikant höher als zum ersten Messzeitpunkt ($p < 0,0001$).

Die porcinen A-Stämme wiesen signifikant niedrigere Zytotoxizität auf als porcine B2-Stämme ($p < 0,001$). Die porcinen A-Stämme enthielten durchschnittlich nur 6,4 VAGs. Weder die exVAGs *papC*, *sfa/foc*, *malX*, *pic*, *cvi/cva* und *iss* noch exVAGs für Siderophore und Invasine waren in den A-Stämmen enthalten. Das einzige in A-Stämmen nachgewiesene Toxin war *hlyA*.

6. Diskussion

6.1 Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay als Screeningmethode

Für die sensitive und spezifische Analyse bestimmter Gene des Bakteriums *E. coli* wurde ein mikropartikelbasierter Multiplex-PCR-Assay (MPMA) entwickelt. Der MPMA beinhaltet acht mPCRs, mit denen 30 exVAGs, 14 inVAGs und zwei Sequenzen für die phylogenetische Einordnung von *E. coli* analysiert werden konnten. Die Detektion der Amplifikate des MPMA mittels VideoScan war im Vergleich zur Standarddetektionsmethode für PCRs, der Agarosegelelektrophorese (AGE), sensitiver (Rödiger *et al.* 2012b). Darüber hinaus erlaubte diese Methode eine spezifische Analyse der entsprechenden Gene im Multiplex-Format, welche sowohl durch die eingesetzten PCR-Primer als auch durch die genspezifischen Oligonukleotidsonden definiert wurde (Frömmel *et al.* 2011). Die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Amplifikate an entsprechende, an Mikropartikel gekoppelte Oligonukleotidsonden und deren Detektion mittels VideoScan erleichterte die Auswertung der mPCRs im Vergleich zur AGE wesentlich durch den Ausschluss unspezifischer Amplifikate. Der MPMA ist schnell, sensitiv und reproduzierbar. Dessen semiautomatisches Handling erlaubt die Analyse vieler Gene und vieler Isolate innerhalb kurzer Zeit (Frömmel *et al.* 2013b).

Im Gegensatz zu den für Multiplex-Mikropartikel-Assays gebräuchlichen Durchflusszytometertechnologien (Fulton *et al.* 1997; Wallace *et al.* 2003; Derveaux *et al.* 2008) basiert die VideoScan-Technologie auf der automatischen Aufnahme und Auswertung zweidimensionaler Bilder. Gegenüber der durchflusszytometrischen Messmethode ergeben sich folgende Vorteile: 1) Die Belichtungszeit zur Detektion des Ligandensignals wird dynamisch für jedes Partikel angepasst, so dass auch extrem schwache Signale präzise gemessen werden können. Die Messzeit für jeweils einzelne Mikropartikel beläuft sich bei Durchflusszytometertechnologien auf einige Mikrosekunden, was den Einsatz eines sehr sensitiven Detektors erfordert. 2) Die Mikropartikel können in der Kavität immobilisiert werden, um die Handhabung, z.B. Waschprozesse zu vereinfachen. 3) Mehrfachmessungen einer Kavität sind möglich. 4) Artefakte, wie Agglomerate, Staub oder Luftblasen werden automatisch als solche erkannt und verfälschen nicht den Messwert. 5) Die Aufnahme von Bildern erlaubt das Nachvollziehen der Messwerte.

Auch mittels Microarray ist es möglich eine hohe Anzahl an Nukleinsäuresequenzen zu detektieren. Eine häufige Anwendung sind DNA-Expressionsanalysen. Die Herstellung der Microarray-Matrix ist technisch herausfordernd. Oligonukleotidsonden für die zu analysierenden Oligonukleotidsequenzen werden mehrfach auf Trägermaterialien gespottet (mindestens vier Auftragsstellen), um die Messwerte statistisch absichern zu können. Diese Spots variieren häufig signifikant und zeigen geringe Redundanz. Die Auswertung von Microarrays erfolgt anhand der Quantifizie-

rung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots in entsprechenden Microarray-Readern. Das Screening mehrerer Hundert Isolate ist mittels Microarray nicht praktikabel.

6.2 Virulenzassoziierte Gene und Phylogenie von *Escherichia coli*

Die Übertragung mobiler genetischer Elemente, welche u.a. VAGs sowie Resistenzgene enthalten, trägt als Anpassungsmechanismus zum Ausgleich des hohen selektiven Drucks auf die *E. coli*-Populationen innerhalb der Wirte bei. Die Diversifizierung der *E. coli* in verschiedenen Lebensräumen wird durch eine hohe Anzahl an VAGs unterstützt, was in einer besseren Anpassung und Persistenz der Stämme in komplexen ökologischen Nischen resultiert (Escobar-Paramo *et al.* 2006; Antao *et al.* 2009). Besonders exVAGs wurden mit der Persistenz von *E. coli* im Intestinaltrakt von Menschen und auch von Ferkeln assoziiert (Wold *et al.* 1992; Nowrouzian *et al.* 2006; Schierack *et al.* 2008; Moreno *et al.* 2009). In diesem Zusammenhang wurden Adhäsine wie S/F1C- (*sfa/foc*), Typ1- (*fimC*) und P- (*papC*) Fimbrien, verschiedene afimbriale Adhäsine sowie das temperatursensitive Hämagglutinin (*tsh*) beschrieben (Antao *et al.* 2009).

Alle innerhalb dieser Arbeit analysierten Isolate enthielten ExPEC typische exVAGs. Die hohe Prävalenz einiger exVAGs wie *ompA*, *fimC* and *csgA* wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen und in dieser Studie bestätigt. Die von Tenailon *et al.* 2010 beschriebene höhere Prävalenz von exVAGs in *E. coli*-Isolaten aus Menschen im Vergleich zu Isolaten aus anderen Organismen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Hervorzuheben sind diesbezüglich, neben *sfa/foc*, die exVAGs *hra* (Adhäsine), *sat* (Toxin), *cvi/cva*, *iss* (Protektine), *malX* (Sonstige) sowie die Siderophore *iroN*, *irp2*, *iucD*, *iutA*, *sitchr* und *sitp*. Typ1-Fimbrien wurden, wie bereits häufig beschrieben (Belanger *et al.* 2011), hoch prävalent in allen *E. coli*-Isolaten der untersuchten Organismen nachgewiesen. Die mit Infektionen im Harnweg assoziierten P-Fimbrien wurden hier in Isolaten aus gesunden und erkrankten Menschen, gesunden Hausschweinen, Fischottern und Dachsen nachgewiesen. Das entsprechende exVAG *papC* kam zusammen mit dem exVAG *mat*, welches für eine Meningitis-assoziierte und temperaturregulierte Fimbrie kodiert, in Isolaten aus Urin harnwegserkrankter Menschen signifikant häufiger vor als in Isolaten aus gesunden Menschen. In Anbetracht des potentiell höheren Virulenzpotentials von Isolaten aus erkrankten Wirten ist der Nachweis des toxinkodierenden exVAGs *cnf1/2* exklusiv in den Isolaten erkrankter Menschen und Hausschweine ein Hinweis auf die Assoziation mit der Infektion des Wirtes.

Das exVAG *tsh* wurde neben den exVAGs *sfa/foc*, *ibeA* (Invasin) sowie den Siderophoren *chuA*, *fyuA* und *iroN* häufiger in Isolaten aus Wildvögeln als aus Wildsäugern nachgewiesen. Die exVAGs *tsh*, *fyuA* und *iroN* wurden bereits mit erhöhter Prävalenz in Isolaten aus Vögeln assoziiert

(Janßen *et al.* 2001; Ewers *et al.* 2007; Mora *et al.* 2010). Die hohe Prävalenz des exVAGs *chuA* ist auf die Phylogenie der Isolate aus Wildvögeln zurückzuführen. Vogelarten waren überwiegend D-Stämme, welche durch *chuA* charakterisiert werden. Im Gegensatz dazu waren Isolate aus Wildsäugern überwiegend B1-Stämme, in denen *chuA* nicht vorkommt.

Die hohe Prävalenz bestimmter exVAGs in *E. coli*-Isolaten aus bestimmten Tierarten, wie z.B. *ireA* und *tia* in Isolaten aus Rehen, weist auf deren besondere Funktion innerhalb dieser Tierarten hin. Die unterschiedliche Prävalenz von exVAGs in bestimmten Tiergruppen ist ein Hinweis darauf, dass die Kolonisation bestimmter Wirte durch *E. coli* mit der Ausprägung jeweils mehrerer verschiedener exVAGs assoziiert ist. Die Analyse der Funktion dieser Gene in entsprechenden Tierinfektionsmodellen, d.h. in Wildtierarten mit entsprechender Nahrung und einem definierten Umfeld ist nahezu unmöglich. Ein besseres Verständnis über die unterschiedlichen Funktionen einzelner Virulenzfaktoren in verschiedenen Wildtierarten kann demnach nur mit weiteren epidemiologischen Studien erlangt werden.

Clermont *et al.* publizierten im Jahr 2000 eine Triplex-PCR für die Einordnung von *E. coli*-Stämmen in die vier phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D (Clermont *et al.* 2000). Eine Validierung dieser Methode mittels MLST verdeutlichte die Zuverlässigkeit der PCR für 80 bis 85% der untersuchten *E. coli*-Stämme (Gordon *et al.* 2008). Gordon *et al.* stellten weiterhin fest, dass 96% der B1- und 94% der B2-Stämme mittels Clermont-PCR richtig zugeordnet wurden. Die Gruppierung in D- und A-Stämme stimmte jedoch in Abhängigkeit der Kombination der drei Sequenzen nur zu 69% (D-Stämme) und 64% (A-Stämme) überein. Clermont-A-Stämme, in denen keine der drei Sequenzen nachgewiesen wurden, konnten mittels MLST sogar nur zu 17% als A-Stämme verifiziert werden. Jedoch sind Stämme mit diesem Genotyp bisher relativ selten (4% bis 9%) nachgewiesen worden (Higgins *et al.* 2007; Walk *et al.* 2007; Gordon *et al.* 2008). Innerhalb dieser Arbeit trat dieser Fall bei 36 (9%) Isolaten auf. Gordon *et al.* unterstützten dennoch den Einsatz der Clermont-PCR in Populationsstudien wie der hier vorliegenden als schnelle, kostengünstige Analysemethode (Gordon *et al.* 2008).

Den Studien von Clermont *et al.* zufolge gehörten pathogene *E. coli* zumeist den phylogenetischen Gruppen B2 und D und kommensale Stämme zumeist den Gruppen A und B1 an (Clermont *et al.* 2000). Dies korrelierte zudem mit einer höheren Prävalenz von VAGs in B2- und D-Stämmen (Clermont *et al.* 2000; Escobar-Paramo *et al.* 2006; White *et al.* 2011), was innerhalb dieser Arbeit bestätigt werden konnte. In B2-Stämmen wurden die meisten VAGs nachgewiesen, gefolgt von D-Stämmen. Diesbezüglich sind die exVAGs *mat* (Adhäsion), *ibeA* (Invasin), *fyuA*, *iroN*, *irp2* (Siderophore), *malX*, *pic* (sonstige) und *vat* (Toxin) hervorzuheben, welche signifikant häufiger in

nicht hämolytischen B2-Stämmen vertreten waren als in D-, B1- und A-Stämmen, was die Ergebnisse anderer Studien bestätigt (Johnson *et al.* 2002; Ewers *et al.* 2007; Moreno *et al.* 2008; Moreno *et al.* 2009; Römer *et al.* 2012).

Es wurde beschrieben, dass sowohl der Zeitpunkt der Probenahme, das Klima sowie der Status der Domestikation, als auch Charakteristika des Wirtes wie dessen Phylogenie, Ernährung, Gewicht oder Darmmorphologie im Zusammenhang mit der Phylogenie der isolierten *E. coli* stehen (Gordon und Cowling 2003; Escobar-Paramo *et al.* 2006). Die von Escobar-Paramo *et al.* im Jahr 2006 postulierte Dominanz von B2-Stämmen in Menschen und B1-Stämmen in Tieren konnte in dieser Studie bestätigt werden. Jedoch wurde in Proben von Menschen innerhalb der letzten zwanzig Jahre in Frankreich eine Veränderung der phylogenetischen Zusammensetzung der *E. coli* beobachtet (Tenaillon *et al.* 2010). Die Häufigkeit von B2-Stämmen stieg von 10% auf 30%, während die der A-Stämme von 60% auf 30% sank. Andere Studien beschrieben eine Prävalenz von reichlich 40% A-Stämmen in Isolaten aus Menschen (Duriez *et al.* 2001; Escobar-Paramo *et al.* 2006). Die vorliegenden Ergebnisse ordnen sich dazwischen ein. Im Gegensatz zu den nicht hämolytischen Isolaten aus gesunden Menschen (37% A, 42% B2) wurden sowohl in nicht hämolytischen Isolaten aus dem Urin erkrankter Menschen als auch in allen hämolytischen Isolaten signifikant mehr B2- als A-Stämme nachgewiesen (Tab. 19).

Ein wichtiger Faktor der Beeinflussung kommensaler *E. coli* Populationen ist der Status der Domestikation (Escobar-Paramo *et al.* 2006). Diese Aussage wird durch die hohe Prävalenz der A-Stämme in Hausschweinen gegenüber der niedrigeren Prävalenz der A-Stämme in Wildschweinen unterstützt. Die niedrige Prävalenz von B2-Stämmen in Hausschweinen resultiert aus deren Sensitivität gegenüber Antibiotika (Skurnik *et al.* 2008). Da Hausschweine unter erhöhtem antibiotischen Druck stehen, führt dies zur Unterdrückung dieser Stämme (Römer *et al.* 2012).

Die Ernährung und Darmmorphologie des Wirtes beeinflussen ebenfalls die Struktur kommensaler *E. coli* (Gordon und Cowling 2003). Dies wird bei der Betrachtung der Prävalenz phylogenetischer Gruppen der einzelnen Arten ersichtlich. Die Wildsäugerarten dieser Studie enthielten signifikant mehr B1-Stämme, wohingegen in Vögeln D-Stämme überwogen. Beim Vergleich carnivor, herbivor und omnivor Wildtierarten konnte jedoch, im Gegensatz zu anderen Studien (Gordon und Cowling 2003), kein Einfluss der Ernährungsweisen auf die Phylogenie der *E. coli* nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die Komplexität der Einflüsse auf die Verteilung phylogenetischer Gruppen kommensaler *E. coli*. Daher kann die Phylogenie von *E. coli* nur als Teil eines komplexen und multifaktoriellen Einflusses auf Struktur und Verteilung kommensaler sowie pathogener *E. coli* gelten.

6.3 Reservoirie von *Escherichia coli*

6.3.1 Reservoirie extraintestinal pathogener *Escherichia coli*

Der Darm von Menschen und Tieren gilt allgemein als Reservoir für ExPEC (Yamamoto *et al.* 1997; Johnson *et al.* 2003; Schierack *et al.* 2008; Katouli 2010; Belanger *et al.* 2011). ExPEC wurden bereits aus Zuchttieren (Geflügel, Rinder, Schweine), Haustieren (Hunde, Katzen, Pferde) und auch aus Wildtieren (Ratten und Vögeln) isoliert (Schierack *et al.* 2008; Johnson *et al.* 2009b; Ewers *et al.* 2010; Guenther *et al.* 2010a; Sheldon *et al.* 2010). Ausgehend von einer erhöhten Adaptionsfitness der ExPEC an unterschiedliche Habitate aufgrund erhöhter Anzahl an exVAGs, sollten Arten, in denen Stämme mit besonders hoher Prävalenz an exVAGs vorkommen, als Reservoirie für ExPEC eingestuft werden (Katouli 2010). Unter diesem Aspekt muss der Mensch selbst als Hauptreservoir der ExPEC gelten, denn in den Isolaten aus Menschen wurde im Mittel die höchste Anzahl an exVAGs nachgewiesen. Die Rolle des menschlichen Darmes als Reservoir für UPEC wurde bereits in vielen Studien dargestellt, woraus der Infektionsweg als „*fecal-perineal-urethral hypothesis*“ abgeleitet wurde (Yamamoto *et al.* 1997). Hinzu kommt, dass UPEC häufig zur phylogenetischen Gruppe B2 zählen (Katouli 2010), in welche über 42% der Isolate aus Menschen eingeordnet wurden. In Faeces von Hausschweinen wurden innerhalb dieser Arbeit ebenfalls *E. coli* mit einem hohen Anteil exVAGs detektiert. Dies untermauert die bereits nachgewiesene Korrelation der Prävalenz der exVAGs mit einer erfolgreichen Kolonisation des Schweinedarmes (Schierack *et al.* 2008). UPEC aus Hausschweinen enthalten jedoch offensichtlich weniger exVAGs als UPEC aus Menschen (Krag *et al.* 2009), was in dieser Arbeit bestätigt wurde. Wildsäugerarten enthielten Isolate mit unterschiedlicher Menge an exVAGs. Die höchste durchschnittliche Anzahl an exVAGs wurde in Isolaten aus Dachschweinen und Reh ermittelte. Als eines der wichtigsten Reservoirie für ExPEC gilt jedoch der Intestinaltrakt von Vögeln. Beschrieben wurde in dieser Funktion besonders Zuchtgeflügel, welches durch Ausscheidungen für die Verbreitung von APEC verantwortlich gezeichnet wurde (Johnson *et al.* 2007; Mora *et al.* 2009; Mora *et al.* 2010). Zusammenfassend wurde dies als „*avian intestinal reservoir hypothesis*“ bezeichnet (Ewers *et al.* 2009a). Bei der Betrachtung der Isolate aus Wildvögeln wurde ersichtlich, dass in diesem Zusammenhang besonders Sperber und Stockenten hervorzuheben sind.

Die hohe Prävalenz und die Diversität der exVAGs in den intestinalen Isolaten aus Menschen könnten aus der recht flexiblen Ernährungsweise des Menschen im Gegensatz zu einem eher einheitlichen Ernährungsverhalten der Wildtierarten resultieren. *E. coli* haben sich demnach dem veränderlichen intestinalen Milieu des Menschen schnell anzupassen, was durch eine erhöhte Prävalenz und Diversität an exVAGs unterstützt wird. Eine weitere Hypothese bezüglich der hohen Prävalenz von exVAGs in fäkalen Isolaten schreibt der Ess-/Futterhygiene sowie der Umgebungshygiene einen ho-

hen Einfluss auf die Diversifizierung der *E. coli*-Isolate zu. Zusammenfassend wurden innerhalb dieser Studie neben Menschen und Hausschweinen auch Wildsäuger wie Dachse und Rehe sowie Wildvögel, insbesondere Sperber und Stockenten als Reservoir und potentielle Überträger von ExPEC differenziert.

Studien zur Zoonose von ExPEC beschäftigten sich mit dem Vergleich tierischer und humaner ExPEC, wobei oftmals eine hohe phylogenetische Verwandtschaft dieser Isolate festgestellt wurde (Johnson *et al.* 2001; Smith *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2008). Zudem wurde die Übertragung von ExPEC nicht nur von Mensch zu Mensch, sondern auch von Tier zu Mensch und von Mensch zu Tier nachgewiesen (Smith *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2009c). Neben der direkten Übertragung, wurden kontaminierte Lebensmittel, insbesondere Geflügelfleisch als Infektionsquelle beschrieben (Smith *et al.* 2007). Ein weiterer Übertragungsweg von ExPEC aus tierischen Reservoiren auf den Menschen könnte aus der Kontamination der Umwelt durch Gülle oder Kot von Zuchttieren, aber auch von Wildtieren resultieren (Duriez *et al.* 2008; Graham *et al.* 2008; Guenther *et al.* 2010b; Guenther *et al.* 2010c; Belanger *et al.* 2011). Auch in aquatischen Ökosystemen wurden ExPEC nachgewiesen (Hamelin *et al.* 2007), wobei Wasservögel zur Kontamination der Gewässer beitragen (Ewers *et al.* 2009b). Es fehlen jedoch exakte Beweise der Übertragung dieser Pathogene über kontaminierte Speisen, Umwelt- und Wasserressourcen (Belanger *et al.* 2011). So wurden die Quellen der meisten ambulant erworbenen Infektionen durch ExPEC bisher nicht identifiziert (George und Manges 2010). Das zoonotische Potential von ExPEC ist mittlerweile unbestritten, jedoch fehlt aufgrund der hohen Diversität dieser Pathogene in unterschiedlichsten Wirten und der Umwelt nach wie vor das exakte Verständnis über die Verbreitung von ExPEC (Belanger *et al.* 2011). Es sind weitere molekular-epidemiologische Studien von Isolaten der potentiellen Reservoir für ExPEC erforderlich, um Informationen über das zoonotische Potential der ExPEC und die Infektionsrisiken für Menschen, aber auch Zuchttiere, besser beurteilen zu können. Untersuchungen zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen sollten unterstützend zu einer genaueren Analyse der Risiken für ExPEC-Infektionen durchgeführt werden.

6.3.2 Reservoir intestinal pathogener *Escherichia coli*

Die Charakterisierung der Isolate dieser Arbeit als *E. coli*-Pathotypen erfolgte mittels MPMA (mPCR6 und 7) durch die Detektion der für die jeweiligen Pathotypen typischen inVAGs (Vidal *et al.* 2005; Guion *et al.* 2008; Croxen und Finlay 2010). Insgesamt wurden in drei der 81 hämolytischen (3,7%) und 30 der 317 nicht hämolytischen Isolate (9,5%) inVAGs nachgewiesen. Dementsprechend gehörten über 91% (n=365) der Isolate zur Gruppe der Kommensalen oder waren potentiell ExPEC.

Die niedrige Prävalenz der inVAGs kann mit dem Ursprung von 88% der Isolate aus Faeces gesunder Individuen begründet werden. Es wurden EPEC, STEC, ETEC und DAEC detektiert (Tab. 20).

EPEC wurden bisher weltweit vorwiegend aus Menschen und Haustieren isoliert, aEPEC jedoch wesentlich häufiger als tEPEC (Robins-Browne *et al.* 2004). Einige Studien berichten vom Nachweis von EPEC in Wildtieren wie Vögeln und Wiederkäuern (Ishii *et al.* 2007b; Kobayashi *et al.* 2009; Bardiau *et al.* 2010; Oh *et al.* 2011). In der analysierten *E. coli*-Kollektion wurden tEPEC aus Wildkaninchen und Braunbrustigel und aEPEC aus Marder, Feldhase, Waschbär, Eichhörnchen und Dachs isoliert. Die Verbreitung der EPEC in Menschen und Tieren wird durch deren häufigen Nachweis in der Umwelt reflektiert (Hatha *et al.* 2004). So werden immer wieder EPEC in Wasser- und Sedimentproben nachgewiesen (Lauber *et al.* 2003; Higgins *et al.* 2005; Ishii *et al.* 2007a). Dies unterstützt den Sinn der Nutzung von *E. coli* als Indikatorbakterium zur hygienisch-bakteriologischen Überwachung des Trinkwassers als Hinweis auf mögliche Verunreinigung, oder ungenügende Desinfektion des Wassers.

Auch STEC wurden bisher weltweit aus Menschen, Haustieren und Wildtieren isoliert. Als Reservoir gelten allerdings hauptsächlich Wiederkäuer (Beutin *et al.* 1993; Pruijboom-Brees *et al.* 2000; Renter *et al.* 2001; Mainil und Daube 2005; Sanchez *et al.* 2009; Martínez *et al.* 2011; Obwegeser *et al.* 2012). In der Kollektion der hämolytischen Isolate dieser Arbeit wurden STEC aus zwei gesunden Hausschweinen und einer Stockente isoliert. In der Kollektion der nicht hämolytischen Isolate wurde ein STEC aus einem gesunden Menschen, jedoch neun der zehn STEC aus Rehen isoliert. Der Nachweis der STEC in Rehen stützt die Aussage, dass Wildwiederkäuer als Reservoir für STEC gelten. Dies ist für den Infektionsschutz von Menschen relevant, da die Übertragung von STEC über kontaminiertes Fleisch (zu 75%), Wasser und direkten Kontakt mit kontaminierten Tieren oder Schmierinfektionen zwischen Menschen nachgewiesen wurde (Rabatsky-Ehr *et al.* 2002; Fairbrother und Nadeau 2006; Callaway *et al.* 2009). Die Verbreitung der STEC ist im Gegensatz zu EPEC auf weniger Arten begrenzt und ist ein Hinweis auf die Adaption der STEC an deren Wirte (Ishii *et al.* 2007b).

ETEC wurden bisher hauptsächlich aus erkrankten Menschen, Rindern und Schweinen isoliert (Nagy und Fekete 1999; Ramzan 2001; Davidson *et al.* 2002). Studien zum Nachweis von ETEC in Wildtieren sind bisher selten. Deshalb erscheint es bemerkenswert, dass die aktuell analysierte *E. coli*-Kollektion ETEC sowohl aus Mensch und Hausschwein, jedoch auch aus einem Reh und einem Rotfuchs enthielt. Wie für EPEC und STEC beschrieben, gelten sowohl kontaminierte Speisen als auch Wasser prinzipiell als übertragende Medien (Nataro und Kaper 1998).

Im Allgemeinen ist die Assoziation der DAEC mit Durchfallerkrankungen weniger ausgeprägt als bei anderen *E. coli*-Pathotypen (Torres *et al.* 2005; Le Bouguéneec und Servin 2006). Zudem scheinen F1845-Fimbrien enthaltende potentielle DAEC nur Menschen zu kolonisieren (Nataro und Kaper 1998; Servin 2005; Kayser *et al.* 2010). Dieses bestätigend wurde das inVAG *daaD* in der aktuell untersuchten *E. coli*-Kollektion lediglich in humanen Isolaten detektiert.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund des Nachweises von *E. coli*-Pathotypen im Kot von zehn Wildtierarten, Hausschweinen und Menschen der Darm dieser Arten als Reservoir für InPEC eingeordnet werden muss. Innerhalb dieser Arbeit wurden InPEC besonders häufig in Rehen und Feldhasen nachgewiesen, wodurch diese Arten als potentielle Reservoir für InPEC hervorgehoben werden.

6.4 Adhäsion von *Escherichia coli* auf Epithelzellen

Die zellkulturbasierten Adhäsionsassays erlaubten das Screening der Adhäsionsrate der 317 nicht hämolytischen *E. coli*-Isolate auf vier verschiedenen Epithelzelllinien (Frömmel *et al.* 2013b).

Das Intestinum warmblütiger Organismen ist das natürliche Habitat von *E. coli* (Gordon und Cowling 2003). Demzufolge bestand die Annahme, dass mehr Isolate an intestinalen Epithelzelllinien adhäreren könnten. Tatsächlich adhärerten weitaus mehr Isolate an intestinalen Epithelzelllinien im Vergleich zu Uro-Epithelzelllinien. Dies ist auf die Analyse fäkaler Isolate zurückzuführen. Zudem adhärerten die Isolate häufiger an humanen als an porcinen Zelllinien. Eine Charakterisierung der Zelllinien könnte diesbezüglich zu einer Erklärung dieses Phänomens beitragen. Es adhärerten auch Isolate aus Faeces von Wildtieren, Menschen und Hausschweinen auf Uro-Epithelzelllinien, wodurch die Hypothese gestützt wird, welche das Intestinum als Reservoir für UPEC beschreibt (Schlager *et al.* 2002; Anderson *et al.* 2003; Moreno *et al.* 2006; Moreno *et al.* 2008). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Adhäsionsrate der intestinalen Isolate von Menschen und aus dem Urin von Menschen auf den humanen Zelllinien Caco-2 und 5637 ermittelt. Auch für die Isolate aus gesunden und kranken Hausschweinen wurden keine signifikanten Unterschiede der Adhäsionsrate auf den porcinen Zelllinien IPEC-J2 und PK-15 festgestellt. Zudem impliziert die starke Adhäsionsrate einiger fäkaler Isolate auf 5637- und PK-15-Zellen deren potentielle Uropathogenität. Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls die Hypothese der Kolonisierung des Intestinaltraktes durch potentielle ExPEC (Yamamoto *et al.* 1997).

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Prävalenz von VAGs in kommensalen *E. coli* mit erfolgreicher Kolonisation des Intestinaltraktes von Menschen und Tieren (Wold *et al.* 1992; Nowrouzian *et al.* 2006; Schierack *et al.* 2008; Moreno *et al.* 2009). Einige Adhäsine welche durch

inVAGs codiert werden (z.B. Intimin) sind bereits gut erforscht. Johnson *et al.* publizierten 2009 zudem einen Zusammenhang zwischen der Adhäsion des hitzeempfindlichen *E. coli* Enterotoxins, welches vom inVAG *elt* codiert wird und nicht als Adhäsion gilt (Johnson *et al.* 2009a). Dadurch wird die Multifunktionalität der VAGs verdeutlicht. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Prävalenz von VAGs und der Adhäsion an Epithelzellen bestätigt. Die stärksten Adhäsionsraten zeigten B2-Stämme mit deren höchster Prävalenz an VAGs, besonders der exVAGs für Siderophore. Siderophore wurden bereits als Kolonisationsfaktoren von *E. coli* in Schweinen beschrieben (Schierack *et al.* 2008; Römer *et al.* 2012). Eisen als Spurenelement ist beteiligt am gesamten Energiestoffwechsel sowie auch der Genexpression und der DNA-Synthese. Durch eine hohe Prävalenz verschiedener Siderophore sind *E. coli* zur Anpassung und zum Wachstum in unterschiedlichen Mikrohabitaten befähigt (Janßen *et al.* 2001). Besonders in Umgebungen wie dem Intestinaltrakt, in dem Eisen limitiert ist, haben *E. coli* mit Siderophoren einen Konkurrenzvorteil innerhalb gemischter Mikrobengemeinschaften (Schaible und Kaufmann 2004).

Innerhalb dieser Arbeit konnte ein Einfluss einzelner VAGs auf die Adhäsionsfähigkeit von *E. coli* an Epithelzelllinien ermittelt werden (Frömmel *et al.* 2013b). Die Prävalenz der exVAGs *afa/dra/daaD* war mit der Adhäsion auf humanen Caco-2- und 5637-Zellen assoziiert. Afa/Dr/F1845 Adhäsine gelten als charakterisierende Faktoren der DAEC. Die VAGs *daaD* und *afa/dra* waren die einzigen VAGs, welche ausschließlich in humanen Isolaten detektiert wurden. Diese Isolate wiesen mit der starken Adhäsionsfähigkeit auf Caco-2- und 5637-Zellen eine spezifische Affinität zu humanen Zellen auf. Spezifische Bindungsaffinitäten wurden bereits für einen humanen Afa/Dr⁺ DAEC nachgewiesen, welcher zwar an den humanen *decay-accelerating factor* (DAF, CD55) binden konnte, jedoch nicht an DAF von Mäusen, Ratten oder Schweinen (Hudault *et al.* 2004).

Der für *E. coli* Nissle 1917 beschriebene Einfluss der S/F1C-Fimbrien auf die Adhäsion an IPEC-J2-Zellen wurde in dieser Arbeit bestätigt (Schierack *et al.* 2011). Isolate, in denen das exVAG *sfa/foc* detektiert wurde, adhärten zelllinienspezifisch auf IPEC-J2-Zellen. S/F1C-Fimbrien wurden bisher weitestgehend mit der Adhäsion an Zellen des Urinaltraktes assoziiert (Bäckhed *et al.* 2002). Die adhärenen *sfa/foc*⁺ Isolate waren vorwiegend B2-Stämme, wodurch wiederum die höhere Adhäsionsfähigkeit der B2-Stämme bestätigt wurde (Römer *et al.* 2012).

Das ColicinV-Plasmid assoziierte exVAG *tsh* (*temperature sensitive hemagglutinin*) (Provence und Curtiss 1994) kodiert für ein Autotransporter-Protein mit Ähnlichkeiten zu einer Subklasse der IgA-Protease-Familie (Dozois *et al.* 2000). Es wurde hoch prävalent in APEC-Stämmen gefunden, woraus ein zoonotisches Risiko für Menschen abgeleitet wurde (Janßen *et al.* 2001; Ewers *et al.* 2007; Mora *et al.* 2010). Trotzdem wurde in einer Studie gezeigt, dass *tsh* nicht für die hohe Virulenz der

APEC verantwortlich ist (Tivendale *et al.* 2004). In Funktionsanalysen wurde neben der proteolytischen Aktivität auch ein positiver Einfluss auf die Adhäsion und Kolonisation im Respirationsstrakt von Vögeln festgestellt (Kostakioti und Stathopoulos 2004; Kobayashi *et al.* 2010). Weiterhin wurde ein Einfluss auf die Adhäsion an Erythrozyten und isoliertes Hämoglobin und an die Proteine der extrazellulären Matrix Fibronectin und ColicinV beschrieben (Kostakioti und Stathopoulos 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter zelllinienspezifischer Einfluss des *tsh* auf die Adhäsion an humanen intestinalen Caco-2-Zellen ermittelt. Isolate mit *tsh* wurden vorwiegend aus Wildvögeln, Menschen und Schweinen isoliert. Die hohe Adhäsionsfähigkeit der *tsh*⁺-Isolate aus unterschiedlichen Arten an humane intestinale Zelllinien impliziert zum Einen dessen Funktion als Kolonisationsfaktor im Intestinum und zum Anderen das zoonotische Potential entsprechender Isolate aus den verschiedenen Arten, besonders aus Wildvögeln. Durch die Multifunktion des Proteins Tsh sowohl als Adhäsionsfaktor für humane intestinale Epithelzelllinien als auch als Proteolytikum wird die Komplexität der Wirkmechanismen von exVAGs und damit auch von ExPEC, deren Übertragung, Verbreitung, Pathogenese und Zoonose im Allgemeinen deutlich.

Es wurden weitere VAGs differenziert, welche mit einer höheren Adhäsionsrate auf einer jeweils spezifischen Zelllinie assoziiert waren (Frömmel *et al.* 2013b). Dies waren die exVAGs *pic* (39 Isolate mit diesem exVAG), *ibeA* (57), *vat* (55), *tsh* (31), *mat* (257), *fyuA* (94), *malX* (62), *irp2* (94) und *papC* (12). Die Assoziation jedes dieser exVAGs mit der Adhäsion zumeist auf einer bestimmten Zelllinie wird durch die Anzahl der Isolate untermauert. Die Ergebnisse implizieren einen Kolonisationsvorteil von *E. coli*-Isolaten mit einer Vielzahl an exVAGs. Dies wird an der hohen Anzahl an VAGs ersichtlich, welche mit der Adhäsion auf Caco-2-Zellen assoziiert sind. In Expressions- und Funktionsanalysen dieser VAGs und der entsprechenden Proteine muss die Funktion dieser exVAGs als Adhäsion verifiziert werden.

6.5 Adhäsionsmuster

6.5.1 Adhäsionsmuster kommensaler *Escherichia coli*

Die Definition intestinaler *E. coli*-Pathotypen erfolgt neben dem Nachweis bestimmter VAGs (Vidal *et al.* 2005; Guion *et al.* 2008; Croxen und Finlay 2010) durch spezifische Adhäsionsmuster, die auf HEp-2 und HeLa-Zellen charakterisiert und definiert wurden (Nataro und Kaper 1998). Jedoch nur wenige Untersuchungen beschreiben wirtszell- und gewebespezifische Adhäsionsmuster kommensaler und potentiell pathogener *E. coli* aus gesunden Wirten auf intestinalen Epithelzelllinien (Sonntag *et al.* 2005). Die meisten der 317 nicht hämolytischen Isolate adhärten unterschiedlich stark und mit unterschiedlichen Adhäsionsmustern auf den Epithelzelllinien (Frömmel *et al.* 2013a). Einige Isolate jedoch waren in der Lage, ein bestimmtes Adhäsionsmuster auf allen Zelllinien auszubilden.

Dies impliziert ein reiches Spektrum an Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen der verschiedenen *E. coli* in den Mikrohabitaten sowohl des Intestinaltraktes als auch des Urinaltraktes.

Diffus verteilt adhärierende Isolate wurden unter den nicht hämolytischen Isolaten häufiger detektiert als mikrokolonienbildende Isolate. Interessanterweise zeigte sich, dass die Ausbildung des diffusen Adhäsionsmusters größtenteils spezifisch gegenüber den eingesetzten Zelllinien war. Dieses für DAEC typische Adhäsionsmuster wurde auch von anderen *E. coli*-Stämmen ausgebildet (Servin 2005). Innerhalb dieser Studie adhärten weitere 146 *daaD*⁻-Isolate diffus. Dies könnte auf eine homogene Verteilung von Wirtszellrezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle, eine Vielfalt von bakteriellen Adhäsinen, jedoch auch auf die Ausprägung eines bestimmten stark affinen Adhäsins zurückzuführen sein. Der häufige Nachweis diffuser Adhäsion kann zudem aus der Vereinzelung initial mikrokolonienbildender Isolate resultieren. Das Phänomen der Auflösung von Mikrokolonien wurde bereits für BFP-exprimierende EPEC nachgewiesen (Knutton *et al.* 1999; Tobe und Sasakawa 2001). EPEC sind dafür bekannt, Mikrokolonien zu bilden. Dies konnte auch für die 14 *eaeA*⁺-(Intimin) Isolate gezeigt werden. Jedoch wurde auch dieses Adhäsionsmuster von weiteren 67 *eaeA*⁻-Isolaten gebildet, wobei mit den eingesetzten *eaeA*-Primern alle bekannten Intimintypen (α , $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 2B$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , ϵ , $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, ζ , $\eta 1$, $\eta 2$, θ , $\iota 1$, $\iota 2$, κ , λ , μ B, ν B, ν R, ξ B, ξ R, \omicron) erfasst wurden. Im Gegensatz zum diffusen Adhäsionsmuster war die Bildung von Mikrokolonien wesentlich weniger spezifisch gegenüber den eingesetzten Zelllinien. Dies lässt vermuten, dass die Ausbildung von Mikrokolonien weniger in Abhängigkeit bestimmter Rezeptoren oder Reaktionen der Wirtszellen erfolgt, sondern eher einen Vorgang der Interaktion der Bakterien miteinander darstellt. Die Adhäsion und die Bildung von Mikrokolonien solcher *eaeA*⁻-*E. coli* sollte in kommenden Studien weiter untersucht und mit der für EPEC typischen Bildung von Mikrokolonien verglichen werden.

Zwei Isolate lagerten sich zu ausgedehnten Agglomeraten auf 5637-Zellen zusammen (Abb. 16D). Dieses Muster unterschied sich klar von aggregativer Adhäsion und entsprach am ehesten einem Biofilm. Die Gründe für die massive Agglomeration zweier Isolate auf dieser einen Zelllinie sind unklar. Sicherlich haben diese Isolate ein hohes Potential zur Bildung von Biofilmen. Wie in Mikrokolonien haben Bakterien in Biofilmen eine erhöhte Resistenz gegen Biozide und Antibiotika sowie gegen das Immunsystem des Wirtes (Donlan und Costerton 2002; Anderson *et al.* 2003; Anderson *et al.* 2004; Beloin *et al.* 2008; Leung *et al.* 2012). Mikrokolonien bilden die initiale Struktur von Biofilmen, die sehr deutlich zur Persistenz bakterieller Infektionen beitragen (Donlan und Costerton 2002). Dies wurde besonders im Zusammenhang mit Infektionen des Urinaltraktes beschrieben (Anderson *et al.* 2003; Justice *et al.* 2004).

Ein weiteres Adhäsionsmuster der nicht hämolytischen *E. coli* war die Kettenbildung, zu welcher elf der Isolate in der Lage waren. *E. coli* Kettenbildung wurde ursprünglich von Gioppo *et al.* 2000 publiziert (Gioppo *et al.* 2000). Eine spätere Studie von Vejborg und Klemm 2009 konnte zeigen, dass *E. coli* diese Ketten aus eindeutig getrennten, miteinander interagierenden Bakterien bildeten. Kettenbildung ist demnach nicht auf eine fehlende Separation nach der Zellteilung zurückzuführen. Zudem wurde die Unabhängigkeit der Kettenbildung von Wachstumsmedien, inklusive LB-Medium, und Substraten festgestellt (Vejborg und Klemm 2009). Isolate der vorliegenden Studie bildeten im LB-Medium allerdings keine Ketten. Kettenbildung erfolgte sowohl in Zellkulturmedien als auch auf Epithelzellen in Anwesenheit von LB- oder Zellkulturmedien. Zudem wurde die Ausbildung längerer Ketten nach Inkubation mit Epithelzellen ersichtlich. Dies deutet auf einen Einfluss der Epithelzellen auf die *E. coli*-Kettenbildung hin. Genaue Mechanismen der Kettenbildung sowie der Einfluss auf die Kolonisierung sollte in weiteren Studien untersucht werden.

6.5.2 Adhäsionsmuster pathogener *Escherichia coli*

Die Adhäsionsmuster der 30 potentiell pathogenen Isolate der aktuellen Kollektion nicht hämolytischer *E. coli* wurden mittels Adhäsionsassay auf humanen und porcinen Zelllinien untersucht (Frömmel *et al.* 2013a). Die Adhäsionsmuster potentieller EPEC und DAEC wurden zusätzlich auf der Modellzelllinie HEp-2 verifiziert. Im Folgenden werden die Adhäsionsmuster dieser Pathogene diskutiert.

EPEC: Alle 14 Intimin-positiven Isolate der vorliegenden Studie bildeten Mikrokolonien auf mindestens zwei Zelllinien. Somit wurden diese Isolate sowohl phänotypisch als auch genotypisch als EPEC identifiziert. Einige der EPEC bildeten Mikrokolonien sowohl auf intestinalen als auch auf Uro-Epithelzelllinien. Mikrokoloniebildung wurde sowohl nach vier als auch nach sechs Stunden Inkubation nachgewiesen. EPEC-Mikrokoloniebildung auf Uro-Epithelzelllinien wurde bisher noch nicht beschrieben. Der Einfluss der Mikrokoloniebildung der EPEC auf Infektionen des Urinaltraktes sollte in weiteren Studien geprüft werden. Gewebe- und Wirtstropismen wurden für EPEC in Abhängigkeit der Ausprägung unterschiedlicher Intimin-Subtypen differenziert (Phillips *et al.* 2000; Reece *et al.* 2001; Fitzhenry *et al.* 2002; Mundy *et al.* 2007). Der Nachweis der gewebespezifischen Mikrokoloniebildung einiger EPEC Isolate auf intestinalen Zelllinien stützt diese Aussage.

Es wurde beschrieben, dass aEPEC nicht zwingend auf HEp-2-Zellen adhärerten (Scaletsky *et al.* 2010). Adhärerten aEPEC jedoch mit einem spezifischen Adhäsionsmuster auf HEp-2-Zellen, konnte dies auch auf anderen Zelllinien wie Caco-2, T84 und HT29 reproduziert werden (Rocha *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu war die Mikrokoloniebildung auf beiden eingesetzten intestinalen Zelli-

nien in dieser Arbeit lediglich für die Hälfte der auf HEp-2-Zellen mikrokolonienbildenden aEPEC/tEPEC reproduzierbar. Auf IPEC-J2-Zellen wurden von den isolierten EPEC häufiger Mikrokolonien gebildet als auf HEp-2-Zellen. Durch den Nachweis höherer Adhäsionsraten wurde die Zelllinie IPEC-J2 bereits für die Analyse der Adhäsion und Pathogenese porciner EHEC und ETEC vorgeschlagen (Koh *et al.* 2008; Yin *et al.* 2011). Die Verwendung der Zelllinie IPEC-J2 ist nach der vorliegenden Analyse auch als Alternative zu HEp-2-Zellen zur Differenzierung des EPEC-Adhäsionsphänotyps zu empfehlen.

STEC: Die Adhäsionsrate der STEC war auf allen getesteten Zelllinien sehr niedrig, womit der für STEC postulierte nichtadhäsive Infektionsmechanismus bestätigt wurde (Kolling und Matthews 1999; Yokoyama *et al.* 2000). Von den zehn mittels Adhäsionsassay untersuchten STEC adhärten sechs Isolate lediglich schwach auf Caco-2-Zellen. Dies unterstützt jedoch die Hypothese der Wirtsspezifität der STEC (Sonntag *et al.* 2005). In besagter Studie wurde beobachtet, dass STEC aus Menschen zwar auf humanen, jedoch nicht auf porcinen intestinalen Zellen adhärten. Die Adhäsion der sechs STEC auf Caco-2-Zellen lässt erkennen, dass STEC eher eine Kolonisierung und Infektion in Menschen, jedoch nicht in Schweinen hervorrufen könnten.

ETEC: In der analysierten *E. coli*-Kollektion wurden vier ETEC mit der Ausbildung völlig unterschiedlicher Adhäsionsmuster detektiert. Aufgrund dessen kann eine Diskussion über die Adhäsionsmusterbildung der ETEC innerhalb dieser Arbeit keine substantiellen Aussagen und Erkenntnisse ergeben.

DAEC: Die zwei humanen *daaD*⁺-Isolate dieser Studie bildeten das für DAEC typische diffuse Adhäsionsmuster sowohl auf HEp-2-Zellen als auch jeweils auf den beiden anderen humanen Zelllinien. Somit wurden diese Isolate sowohl phänotypisch als auch genotypisch als DAEC identifiziert. Das Isolat aus dem Urin eines harnwegserkrankten Menschen bildete dieses Adhäsionsmuster außerdem auf IPEC-J2-Zellen. Der Nachweis diffuser Adhäsion auf HEp-2-Zellen ist jedoch nicht spezifisch für DAEC. Sowohl kommensale als auch pathogene *E. coli*, z.B. DA-EPEC bildeten diesen Phänotyp aus, obwohl sie keinen der für DAEC typischen Adhäsionsfaktoren enthielten (Servin 2005).

6.6 Adhäsion in Abhängigkeit der Wirtsarten der *Escherichia coli*-Isolate

Die Ausprägung bestimmter Spezifitäten von Bakterien, wie Adhäsion an bestimmten Zellen oder in bestimmten Wirten ist prinzipiell für Bakterien nicht sinnvoll, da sie ihren potentiellen Lebensraum dadurch begrenzen würden. In der Ausprägung entsprechender Adhäsions- und Kolonisationsfaktoren in unterschiedlichen Habitaten liegt der große Vorteil von Bakterien mit Genen, die sowohl zur Nährstoffakquise, zu bakterieller Interferenz als auch zu kompetitiver Exklusion führen

(Antao *et al.* 2009). Demgegenüber wurde jedoch z.B. für *Shigella*-Stämme und für *E. coli*-B2-Stämme der Serogruppe O81 eine Spezifität gegenüber Menschen festgestellt (Clermont *et al.* 2008).

Innerhalb dieser Studie wurde ersichtlich, dass *E. coli*-Isolate aus einigen Arten in der Lage waren, besonders stark und spezifisch zu adhären (Frömmel *et al.* 2013b). So war der Anteil adhärenter Isolate aus Eichhörnchen im Vergleich zu Isolaten aus anderen Arten sehr hoch, wobei diese besonders stark wirtsspezifisch auf porcinen Zelllinien adhärten. Weiterhin wurde ersichtlich, dass Isolate aus Amseln stark gewebespezifisch auf intestinalen Zelllinien adhärten. Im Gegensatz dazu waren Isolate aus Wildschweinen und Hausmäusen nicht adhären. Es wurde innerhalb dieser Arbeit allerdings auch ersichtlich, dass die Adhäsion an Uro-Epithelzellen nicht zwingend als Voraussetzung für eine Infektion angesehen werden muss, da 35% der Isolate aus Menschen mit UTI und 40% der Isolate aus Hausschweinen mit UTI an keiner der Zelllinien adhärten. In Infektionsstudien mit EPEC wurde bereits festgestellt, dass eine EPEC-Adhäsion *in vitro* keinen Rückschluss auf die Pathogenität der Stämme *in vivo* zu erlauben scheint (Robins-Browne *et al.* 1994). *In vivo* sind Epithelzellen des Intestinaltraktes mit Mukus überschichtet, wodurch die Bedingungen für die Adhäsion von Bakterien anders als in Zellkulturen sind. Die Untersuchung der Adhäsion von *E. coli* auf unterschiedlichen Zelllinien gibt demnach lediglich Hinweise auf Zusammenhänge und Spezifika der Isolate aus unterschiedlichen Wirten und einer Assoziation mit den nachgewiesenen VAGs.

6.7 Zytotoxizität von *Escherichia coli*

Generell wurden in hämolytischen Isolaten signifikant mehr exVAGs für Adhäsine, Toxine und Siderophore nachgewiesen als in nicht hämolytischen Isolaten. Mit Ausnahme des exVAGs *tsh*, welches lediglich in Isolaten aus Menschen, Hausschweinen und einer Stockente enthalten war, wurden die weiteren sechs exVAGs für Adhäsine (*csgA*, *fimC*, *hra*, *mat*, *papC*, *sfa/foc*) mit einer Prävalenz von über 76% nachgewiesen. Die fimbrienkodierenden exVAGs *papC* und *sfa/foc* wurden bereits sowohl mit UPEC Infektionen als auch mit erhöhter Persistenz in intestinalen Arealen assoziiert (Snyder *et al.* 2005; Lane und Mobley 2007; Antao *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurden neben *hlyA* die exVAGs *vat* und *cnf1/2* ebenfalls mit einer Prävalenz von über 76% detektiert. Das exVAG *vat* wurde bereits in verschiedenen Studien in 70% der hämolytischen Isolate nachgewiesen (Smith *et al.* 2008; Wiles *et al.* 2008b). Die drei Toxine gelten als UPEC-assoziiert. Die Coexpression von Cnf1/2 und α -Hämolyisin wurde bereits nachgewiesen (Landraud *et al.* 2003). Cnf1 induziert u.a. die Apoptose von Blasenepithelzellen, was den bakteriellen Zugriff auf tiefer liegende Gewebe fördert (Mills *et al.* 2000). In Abhängigkeit des Cnf1 wurde die Induktion apoptotischer Vorgänge auch in 5637-Zellen nachgewiesen (Mills *et al.* 2000). Infektionen eines 5637-Monolayers sowohl mit einem *hlyA⁺cnf1⁺*UPEC als auch mit einer *cnf*-defizienten Mutante (*hlyA⁺cnf⁻*) führten bereits nach zwei Stunden zur Reduktion des

Monolayers um über 50% (Smith *et al.* 2006). Ähnliche Effekte wurden auf HeLa- und T24-Zellen sowie auf humanen neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und im Ratteninfektionsmodell beschrieben (De Rycke *et al.* 1996; Island *et al.* 1998; Russo *et al.* 2005; Kraemer *et al.* 2012). Zytotoxische Effekte konnten innerhalb dieser Arbeit auf allen Epithelzelllinien nachgewiesen werden. Interessant war die Tatsache, dass 62% der hämolytischen Isolate aus Hausschweinen der vorliegenden Arbeit A-Stämme waren. Diese wiesen neben einer sehr niedrigen durchschnittlichen Anzahl an VAGs pro Isolat eine signifikant niedrigere Zytotoxizität als die porcinen B2-Stämme auf. In allen hämolytischen A-Stämmen wurde kein *cnf1/2* nachgewiesen. In der Studie von Smith *et al.* 2006 wurde gezeigt, dass durch eine *hlyA* defiziente Mutante des *hlyA⁺cnf1⁺*UPEC nach zwei Stunden Inkubation keine zytotoxischen Effekte an 5637-Zellen auftraten (Smith *et al.* 2006), worauf *hlyA* für die Zytotoxizität verantwortlich gezeichnet wurde. Innerhalb dieser Arbeit konnte demnach bestätigt werden, dass *hlyA* zytotoxische Effekte auslöst. Enthielten hämolytische Isolate zudem das exVAG *cnf1/2* traten zytotoxische Effekte deutlich verstärkt auf.

Die Wirkung des α -Hämolysins und des Cnf1 ist zeitabhängig (Smith *et al.* 2008). Das membranzerstörende α -Hämolysin wird zu Beginn einer Infektion sezerniert und zeigt zeitnah eine zytotoxische Wirkung. Diese lässt im Verlauf der Infektion nach, was aus der Neutralisierung des Toxins durch Antikörper des Wirtes resultieren könnte (Seetharama *et al.* 1988). Jedoch ist dieser Vorgang für *in vitro* Zellkulturassays irrelevant. Im Gegensatz dazu scheint Cnf1 als intrazellulär wirkendes Toxin langsamer zu wirken, jedoch konstant sezerniert zu werden (Smith *et al.* 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Steigerung der zytotoxischen Wirkung bei steigender Inkubationszeit. Dies kann auf die längere Wirkungsdauer, aber auch auf die steigende Konzentration der Bakterien und somit der Konzentration des α -Hämolysins während längerer Inkubationszeit zurückzuführen sein. Eine besonders hohe Steigerung von über 46% zerstörten Monolayers zwischen vier und sechs Stunden Inkubation wurde auf porcinen Zelllinien gemessen. Auf humanen Zelllinien trat die Wirkung schneller ein und steigerte sich über die Zeit um bis zu 16%. Um die Ursachen dessen zu verstehen, bedarf es weiterer Analysen, die eine genauere Charakterisierung der Eigenschaften der Epithelzellen einschließen müssen.

Die Prävalenz der exVAGs für Siderophore war in den hämolytischen Isolaten signifikant höher als in nicht hämolytischen Isolaten. Es wurden fünf exVAGs für Siderophore (*chuA*, *fyuA*, *iroN*, *irp2*, *sitChr*) mit einer Prävalenz von über 70% detektiert. Die exVAGs *chuA*, *fyuA*, *iroN* und *sitChr* wurden bereits mit UPEC und APEC assoziiert (Johnson und Russo 2002; Johnson *et al.* 2006; Ewers *et al.* 2007). Aufgrund der hohen Prävalenz des exVAGs *irp2* (90%) in den hier untersuchten Isolaten ist davon auszugehen, dass auch dieses exVAG zur Fitness hämolytischer Isolate beiträgt. Die hohe

Prävalenz der Adhäsine, Toxine und Siderophore ist demnach wesentlich für eine effiziente Nährstoffakquisition und Adaption an unterschiedliche Gewebe (Antao *et al.* 2009). Das hoch prävalente Vorkommen der für ExPEC typischen exVAGs in hämolytischen Isolaten ist ein Indiz für eine hohe potentielle extraintestinale Pathogenität dieser Isolate, was zudem durch die Zytotoxizität gegenüber den Uro-Epithelzelllinien unterstützt wird.

Die Zytotoxizität wurde häufig für Zellen und Gewebe des Urinaltraktes beschrieben (Smith *et al.* 2008). Jedoch wurde innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen, dass hämolytische *E. coli*-Isolate auch erhebliche Zytotoxizität gegenüber intestinalen Zelllinien, besonders LoVo, hervorriefen. Besonders zytotoxisch verhielten sich Isolate aus Wildtieren auf humanen Zelllinien, wobei diese bereits nach dem ersten Messzeitpunkt nahezu ihre volle zytotoxische Wirkung entfaltet hatten. Beim Vergleich der Prävalenz der VAGs in den hämolytischen Isolaten aus Wildtieren mit den hämolytischen Isolaten aus Menschen und Schweinen fiel die erhöhte Prävalenz der Adhäsingene *mat* und *papC* sowie der Siderophorgene *fyuA*, *ireA* und *irp2* auf. Bereits 1971 wurde in einer Studie von Smith und Linggood die zytotoxische Wirkung eines hämolytischen Stammes an der Mukosa sowohl von der Konzentration des α -Hämolytins als auch in Abhängigkeit von der Adhäsionsfähigkeit eines entsprechenden Stammes beschrieben (Smith und Linggood 1971). Die hohe Zytotoxizität der Isolate der Wildtiere könnte demnach mit der hohen Prävalenz von Adhäsingenen wie *mat* und *papC* in Coexpression mit den Toxingenen *hlyA*, *cnf1/2* und *vat* assoziiert sein. In Kombination mit den hoch prävalenten Siderophorgenen *fyuA*, *ireA* und *irp2* erlangten diese Isolate womöglich ihre hohe Fitness mit zytotoxischen Folgen, besonders schnell gegenüber humanen Epithelzelllinien. Für ein besseres Verständnis der Rolle dieser exVAGs bezüglich der Zytotoxizität sollten Genexpressions- und Proteinfunktionsanalysen durchgeführt werden.

Mobley *et al.* berichteten 1990 von Isolaten aus Menschen mit Pyelonephritis, welche im Vergleich zu fäkalen Kontrollstämmen erhöhte Zytotoxizität aufwiesen (Mobley *et al.* 1990). Im Gegensatz dazu zeigten in dieser Arbeit Isolate aus Menschen mit UTI im Vergleich zu humanen intestinalen Isolaten signifikant niedrigere Zytotoxizität, obwohl in Isolaten aus Urin die Prävalenz der exVAGs *papC* und *pic* signifikant höher war. Unterschiedlich war auch die Zytotoxizität in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Die Isolate aus Menschen mit UTI hatten zum ersten Messzeitpunkt auf allen Zelllinien wesentlich weniger Zellen zerstört als die fäkalen humanen Isolate. Offensichtlich konnten die Zelllinien der zytotoxischen Wirkung der Isolate aus dem Urin sowohl stärker als auch länger entgegenwirken. Die Zytotoxizität aller intestinalen Isolate sowohl auf intestinalen Zelllinien des Menschen und des Schweins, aber auch auf humanen und porcinen Uro-Epithelzelllinien untermauert die Beobachtung des erhöhten Infektionsrisikos durch hämolytische *E. coli* (Mobley *et al.* 1990; Smith *et*

al. 2008). Die hohe Zytotoxizität gerade der Isolate aus Wildtieren gegenüber humanen Zelllinien zeigt das Risiko zoonotischer Infektionen durch entsprechende *E. coli*-Stämme. Zudem wurde mit dem Nachweis der Zytotoxizität auf Uro-Epithelzelllinien deren hohes Potential, extraintestinale Infekte hervorzurufen, verdeutlicht. Diese Ergebnisse stärken die „*fecal-perineal-urethral hypothesis*“ (Yamamoto *et al.* 1997; Abe *et al.* 2008).

6.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Screeningverfahren sind auf zuvor festgelegte Kriterien ausgerichtete, orientierende Vorauswahltests. Unter definierten Testbedingungen werden systematisch umfassende Analysen mit einer großen Probenanzahl durchgeführt. Die Ausrichtung der Screeningtests auf die Lösung exakter Fragestellungen ermöglicht Analysen von Strukturen oder Substanzen, die in nachfolgenden Tests auf ihre Funktionalität genauer untersucht werden müssen. Statistische Sicherheit wird bei Screeningverfahren durch eine zufällige Auswahl der Proben und eine sehr große Probenanzahl erreicht. Die Ergebnisse können durch die Auswahl der Analyseparameter und der Proben beeinflusst werden. Mit Screeningverfahren können zudem falsch negative und auch falsch positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Positive Ergebnisse eines Screenings bedeuten nicht automatisch eine Funktionalität oder Potenz des entsprechenden Parameters.

Für diese Arbeit bedeutet dies, dass die Ergebnisse und deren Assoziationen von der Auswahl sowohl der analysierten Gene als auch der *E. coli*-Isolate abhängig sind. Definierte teilautomatisierte Testbedingungen mit einem großen Testvolumen (96-Well-Platten) und computergestützten Detektionsverfahren (VideoScan) sicherten die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander. Um gesicherte statistische Aussagen zu erhalten, wurde eine große Anzahl von *E. coli*-Isolaten aus jeweils einer Wirtsart untersucht. Jedoch ist es unmöglich die Probenahme von *E. coli*-Isolaten, besonders aus Wildtieren, bezüglich des Zeitpunktes, des Lebensraumes und des Gesundheitszustandes zu standardisieren und zu reproduzieren.

Mit den in dieser Arbeit etablierten Screeningmethoden wurde eine Anzahl von 398 *E. coli*-Isolaten auf das Vorhandensein von 44 VAGs und zwei Sequenzen für die Phylogenie von *E. coli*, auf ihre Adhäsionsfähigkeit an den Zelllinien Caco-2, 5637, IPEC-J2, PK-15 sowie ihrer Toxizität gegenüber den Zelllinien LoVo, 5637, IPEC-J2, PK-15 getestet. Die Adhäsionsmusterbildung der als EPEC und DAEC differenzierten *E. coli*-Isolate wurde zusätzlich auf der Modell-Zelllinie HEp-2 analysiert.

Die Ergebnisse geben eine Übersicht über:

-
- a) die Prävalenz von VAGs in *E. coli*-Isolaten bestimmter Wirtsarten und damit von Reservoiren potentiell pathogener *E. coli*,
 - b) die Adhäsionsraten und Adhäsionsmuster der *E. coli*-Isolate auf verschiedenen Zelllinien,
 - c) mit der Adhäsion auf bestimmten Zelllinien assoziierte VAGs,
 - d) die Toxizität hämolytischer *E. coli*-Isolate gegenüber verschiedenen Zelllinien.

Die Expression der detektierten VAGs wurde mit diesen Assays nicht analysiert. Die Ergebnisse der drei Screeningverfahren bilden die Basis für weiterführende Analysen einzelner Parameter, Isolate und Beobachtungen. Für die mittels MPMA und statistischen Analysen gefilterten adhäsionsassoziierten VAGs sind nachfolgend Genexpressionsstudien erforderlich. Diese Analysen können mit Real-time-PCR-Assays realisiert werden. Im Anschluss daran sind die entsprechenden Proteine hinsichtlich ihrer Expression und Funktionalität zu analysieren. Adhäsionstests mit *E. coli*, in denen die adhäsionsassoziierten VAGs deletiert sind, zeigen die Auswirkung auf die Adhäsionsfähigkeit im Vergleich zum entsprechenden *E. coli*-Wildtyp. Nach erfolgreicher *in vitro* Selektion von Adhäsionsfaktoren verhelfen *in vivo*-Analysen in Modellorganismen zu einer Verifizierung deren Funktion. Parallel besteht die Möglichkeit des Screenings weiterer *E. coli*-Gene um einen umfassenderen Pool an potentiell mit der Kolonisierung des Intestinums assoziierten Gene anzulegen. So kann der Einfluss von VAGs, insbesondere von exVAGs, auf die Besiedlung und damit die Adhäsion von *E. coli* an Epithelzellen des Darmtraktes, jedoch auch des Harntraktes in Menschen und Hausschweinen schrittweise besser verstanden werden.

7. Literatur

- Abe, C. M., F. A. Salvador, I. N. Falsetti, M. A. Vieira, J. Blanco, J. E. Blanco, *et al.* (2008) Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52, 397-406.
- Ahmed, N., U. Dobrindt, J. Hacker und S. E. Hasnain (2008) Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Micro.* 6, 387-394.
- Albert, M. J., V. I. Mathan und S. J. Baker (1980) Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature.* 283, 781-782.
- Anderson, B. N., A. M. Ding, L. M. Nilsson, K. Kusuma, V. Tchesnokova, V. Vogel, *et al.* (2007) Weak rolling adhesion enhances bacterial surface colonization. *J Bacteriol.* 189, 1794-1802.
- Anderson, G. G., K. W. Dodson, T. M. Hooton und S. J. Hultgren (2004) Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol.* 12, 424-430.
- Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser und S. J. Hultgren (2003) Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 301, 105-107.
- Antao, E. M., L. H. Wieler und C. Ewers (2009) Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* 1, 22.
- Bäckhed, F., B. Alsen, N. Roche, J. Angstrom, A. von Euler, M. E. Breimer, *et al.* (2002) Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem.* 277, 18198-18205.
- Bäckhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, *et al.* (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS.* 101, 15718-15723.
- Bäckhed, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson und J. I. Gordon (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 307, 1915-1920.
- Bardiau, M., F. Gregoire, A. Muylaert, A. Nahayo, J. N. Duprez, J. Mainil, *et al.* (2010) Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. *J Appl Microbiol.* 109, 2214-2222.
- Bauer, E., B. A. Williams, H. Smidt, M. W. Versteegen und R. Mosenthin (2006) Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intest Microbiol.* 7, 35-51.
- Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother und J. Harel (2003) Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *J Clin Microbiol.* 41, 2113-2125.
- Belanger, L., A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau und C. M. Dozois (2011) *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 62, 1-10.
- Beloin, C., A. Roux, J. M. Ghigo und T. Romeo (2008) *Escherichia coli* Biofilms, pp 249-289, Springer Berlin Heidelberg
- Beutin, L., D. Geier, H. Steinruck, S. Zimmermann und F. Scheutz (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 31, 2483-2488.
- Beutin, L., O. Marches, K. A. Bettelheim, K. Gleier, S. Zimmermann, H. Schmidt, *et al.* (2003) HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. *Infect Immun.* 71, 3995-4002.
- Beutin, L., H. Steinruck, G. Krause, K. Steege, S. Haby, G. Hultsch, *et al.* (2007) Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J Appl Microbiol.* 102, 630-639.
- Bier, F. F. und S. Schumacher (2011) Biosensoren der Zukunft: patientennahe in vitro-Diagnostik für personalisierte Medizin. *Public Health Forum.* 19, 26.e1-26.e4.

- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277, 1453-1462.
- Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson und C. L. Gyles (1999) Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*. 37, 497-503.
- Boisen, N., F. Scheutz, D. A. Rasko, J. C. Redman, S. Persson, J. Simon, *et al.* (2012) Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis*. 205, 431-444.
- Bonacorsi, S. und E. Bingen (2005) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol*. 295, 373-381.
- Boudeau, J., A. L. Glasser, S. Julien, J. F. Colombel und A. Darfeuille-Michaud (2003) Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 18, 45-56.
- Callaway, T. R., M. A. Carr, T. S. Edrington, R. C. Anderson und D. J. Nisbet (2009) Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol*. 11, 67-79.
- Casey, T. und B. T. Bosworth (2009) Design and Evaluation of a Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Identification of Genes for Nine Different Virulence Factors Associated with *Escherichia coli* that Cause Diarrhea and Edema Disease in Swine. *J Vet Diagn Invest*. 21, 25-30.
- Castellani, A. und A. J. Chalmers (1919) *Manual of tropical medicine*, Williams Wood, New York
- Cavaliere, S. J., G. A. Bohach und I. S. Snyder (1984) *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev*. 48, 326-343.
- Cebra, J. J. (1999) Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*. 69, 1046S-1051S.
- Celli, J., W. Deng und B. B. Finlay (2000) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol*. 2, 1-9.
- Chansiripornchai, N., P. Ramasoota, J. Sasipreeyajan und S. B. Svenson (2001) Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet Microbiol*. 80, 75-83.
- Chapman, T. A., X.-Y. Wu, I. Barchia, K. A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, *et al.* (2006) Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol*. 72, 4782-4795.
- Chowdhury, S. R., D. E. King, B. P. Willing, M. R. Band, J. E. Beever, A. B. Lane, *et al.* (2007) Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC Genomics*. 8.
- Clarke, S. C. (2001) Diarrhoeagenic *Escherichia coli*-an emerging problem? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 41, 93-98.
- Clermont, O., S. Bonacorsi und E. Bingen (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 66, 4555-4558.
- Clermont, O., M. Lescat, C. L. O'Brien, D. M. Gordon, O. Tenaillon und E. Denamur (2008) Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol*. 10, 1000-1006.
- Collado, M. C., J. Meriluoto und S. Salminen (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol*. 45, 454-460.
- Connell, H., P. de Man, U. Jodal, K. Lincoln und C. Svanborg (1993) Lack of association between hemolysin production and acute inflammation in human urinary tract infection. *Microb Pathog*. 14, 463-472.
- Croxen, M. A. und B. B. Finlay (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 8, 26-38.
- Davidson, G., G. Barnes, D. Bass, M. Cohen, A. Fasano, O. Fontaine, *et al.* (2002) Infectious diarrhea in children: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 35 143-150.

- De Rycke, J., P. Mazars, J. P. Nougayrede, C. Tasca, M. Boury, F. Herault, *et al.* (1996) Mitotic block and delayed lethality in HeLa epithelial cells exposed to *Escherichia coli* BM2-1 producing cytotoxic necrotizing factor type 1. *Infect Immun.* 64, 1694-1705.
- Derveaux, S., B. G. Stubbe, K. Braeckmans, C. Roelant, K. Sato, J. Demeester, *et al.* (2008) Synergism between particle-based multiplexing and microfluidics technologies may bring diagnostics closer to the patient. *Anal Bioanal Chem.* 391, 2453-2467.
- Dhakal, B. K. und M. A. Mulvey (2012) The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe.* 11, 58-69.
- Dobrindt, U., U. Hentschel, J. B. Kaper und J. Hacker (2002) Genome plasticity in pathogenic and nonpathogenic enterobacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 264, 157-175.
- Donlan, R. M. und J. W. Costerton (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15, 167-193.
- Donnenberg, M. S. und J. B. Kaper (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 60, 3953-3961.
- Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels und R. Curtiss (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun.* 68, 4145-4154.
- Dudley, E. G., N. R. Thomson, J. Parkhill, N. P. Morin und J. P. Nataro (2006) Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 61, 1267-1282.
- Dunbar, S. A. (2006) Applications of Luminex® xMAP(TM) technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta.* 363, 71-82.
- Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, *et al.* (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology.* 147, 1671-1676.
- Duriez, P., Y. Zhang, Z. Lu, A. Scott und E. Topp (2008) Loss of virulence genes in *Escherichia coli* populations during manure storage on a commercial swine farm. *Appl Environ Microbiol.* 74, 3935-3942.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, *et al.* (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308, 1635-1638.
- Eisenstein, B. und D. Zaleznik (2000) Enterobacteriaceae. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases.* Mandell, G., Bennett, J. und Dolin, R. (eds.), pp 2294-2310, Churchill Livingstone Philadelphia
- Elliott, S. J., S. Srinivas, M. J. Albert, K. Alam, R. M. Robins-Browne, S. T. Gunzburg, *et al.* (1998) Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect Immun.* 66.
- Erwert, R. D., K. T. Eiting, J. C. Tupper, R. K. Winn, J. M. Harlan und D. D. Bannerman (2003) Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis. *Microb Pathog.* 35, 87-93.
- Escherich, T. (1988) The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. *Rev Infect Dis.* 10, 1220-1225.
- Escherich, T. (1989) The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *Rev Infect Dis.* 11, 352-356.
- Escobar-Paramo, P., A. Le Menac'h, T. Le Gall, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, *et al.* (2006) Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol.* 8, 1975-1984.
- Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp und L. H. Wieler (2009a) Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol.* 75, 184-192.

- Ewers, C., M. Grobbel, I. Stamm, P. A. Kopp, I. Diehl, T. Semmler, *et al.* (2010) Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother.* 65, 651-660.
- Ewers, C., S. Guenther, L. H. Wieler und P. Schierack (2009b) Mallard ducks – a waterfowl species with high risk of distributing *Escherichia coli* pathogenic for humans. *Environ Microbiol Rep.* 1, 510-517.
- Ewers, C., T. Janßen, S. Kießling, H.-C. Philipp und L. H. Wieler (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol.* 104, 91-101.
- Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kieling, K. Alt, E.-M. Antão, *et al.* (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 163-176.
- Fairbrother, J. M. und E. Nadeau (2006) *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech.* 25, 555-569.
- Fitzhenry, R. J., D. J. Pickard, E. L. Hartland, S. Reece, G. Dougan, A. D. Phillips, *et al.* (2002) Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut.* 50, 180-185.
- Flint, H. J., E. A. Bayer, M. T. Rincon, R. Lamed und B. A. White (2008) Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol.* 6, 121-131.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz und N. R. Pace (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *PNAS.* 104, 13780-13785.
- Franke, J., S. Franke, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, L. H. Wieler, G. Baljer, *et al.* (1994) Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol.* 32, 2460-2463.
- Frankel, G. und A. D. Phillips (2008) Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol.* 10, 549-556.
- Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, *et al.* (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 185.
- Frömmel, U., I. Berger, S. Rödiger, P. Schierack und C. Schröder (2011) *Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay zum Nachweis bakterieller Gene*, Pabst Science Publishers, ISBN: 978-3-89967-703-4, Lengerich
- Frömmel, U., A. Böhm, J. Nitschke, J. Weinreich, J. Groß, S. Rödiger, *et al.* (2013a) Adhesion patterns of commensal and pathogenic *Escherichia coli* from humans and wild animals on human and porcine epithelial cell lines. *Gut Pathogens.* 5, 31.
- Frömmel, U., W. Lehmann, S. Rödiger, A. Böhm, J. Nitschke, J. Weinreich, *et al.* (2013b) Adhesion of human and animal *Escherichia coli* in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origin. *Appl Environ Microbiol.* 79, 5814-5829.
- Frydendahl, K. (2002) Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol.* 85, 169-182.
- Fulton, R. J., R. L. McDade, P. L. Smith, L. J. Kienker und J. R. Kettman, Jr. (1997) Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem.* 43, 1749-1756.
- Garrido, P., M. Blanco, M. Moreno-Paz, C. Briones, G. Dahbi, J. Blanco, *et al.* (2006) STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Strains. *Clin Chem.* 52, 192-201.

- George, D. B. und A. R. Manges (2010) A systematic review of outbreak and non-outbreak studies of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing community-acquired infections. *Epidemiol Infect.* 138, 1679-1690.
- Gerardin, J., L. Lalioui, E. Jacquemin, C. Le Bouguenec und J. G. Mainil (2000) The afa-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the afa-8 variant. *Vet Microbiol.* 76, 175-184.
- Gioppo, N. M., W. P. Elias, Jr., M. C. Vidotto, R. E. Linhares, H. O. Saridakis, T. A. Gomes, *et al.* (2000) Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS Microbiol Lett.* 190, 293-298.
- Girardeau, J. P., L. Lalioui, A. M. Said, C. De Champs und C. Le Bouguenec (2003) Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the afa-8 operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J Clin Microbiol.* 41, 218-226.
- Giron, J. A., A. S. Ho und G. K. Schoolnik (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 254, 710-713.
- Goldberg, M. B. und P. J. Sansonetti (1993) Shigella subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect Immun.* 61, 4941-4946.
- Gordon, D. M., O. Clermont, H. Tolley und E. Denamur (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol.* 10, 2484-2496.
- Gordon, D. M. und A. Cowling (2003) The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology.* 149, 3575-3586.
- Graham, J. P., J. H. Leibler, L. B. Price, J. M. Otte, D. U. Pfeiffer, T. Tiensin, *et al.* (2008) The animal-human interface and infectious disease in industrial food animal production: rethinking biosecurity and biocontainment. *Public Health Rep.* 123, 282-299.
- Griffin, P. M. und R. V. Tauxe (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 13, 60-98.
- Grossmann, K., D. Roggenbuck, C. Schröder, K. Conrad, P. Schierack und U. Sack (2011) Multiplex assessment of non-organ-specific autoantibodies with a novel microbead-based immunoassay. *Cytometry Part A.* 79A, 118-125.
- Guenther, S., M. Filter, K. Tedin, I. Szabo, L. Wieler, H., K. Nöckler, *et al.* (2009) *Enterobacteriaceae* populations during experimental *Salmonella* infection in pigs, Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS
- Guenther, S., M. Grobbel, J. Beutlich, B. Guerra, R. G. Ulrich, L. H. Wieler, *et al.* (2010a) Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J Antimicrob Chemother.* 65, 582-584.
- Guenther, S., M. Grobbel, K. Heidemanns, M. Schlegel, R. G. Ulrich, C. Ewers, *et al.* (2010b) First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci Total Environ.* 408, 3519-3522.
- Guenther, S., M. Grobbel, A. Lubke-Becker, A. Goedecke, N. D. Friedrich, L. H. Wieler, *et al.* (2010c) Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. *Vet Microbiol.* 144, 219-225.
- Guion, C. E., T. J. Ochoa, C. M. Walker, F. Barletta und T. G. Cleary (2008) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 46, 1752-1757.
- Hacker, J. und J. B. Kaper (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 54, 641-679.
- Hamelin, K., G. Bruant, A. El-Shaarawi, S. Hill, T. A. Edge, J. Fairbrother, *et al.* (2007) Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different

- aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl Environ Microbiol.* 73, 477-484.
- Hancock, V., I. L. Witso und P. Klemm (2011) Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol.* 301, 570-576.
- Harrington, S. M., E. G. Dudley und J. P. Nataro (2006) Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 254, 12-18.
- Hartl, D. L. und D. E. Dykhuizen (1984) The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet.* 18, 31-68.
- Hatha, A. A. M., A. Chandran und K. M. M. Rahiman (2004) Prevalence of diarrhegenic serotypes of *Escherichia coli* in the Cochin estuary, along west coast of India. *Indian J. Mar. Sci.* 33, 238-242.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez und D. Ala'Aldeen (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68, 692-744.
- Hendrickson, B. A., J. Guo, R. Laughlin, Y. Chen und J. C. Alverdy (1999) Increased type 1 fimbrial expression among commensal *Escherichia coli* isolates in the murine cecum following catabolic stress. *Infect Immun.* 67, 745-753.
- Hernandes, R. T., M. A. Vieira, S. M. Carneiro, F. A. Salvador und T. A. Gomes (2006) Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. *J Clin Microbiol.* 44, 4214-4217.
- Hiemann, R., T. Buttner, T. Krieger, D. Roggenbuck, U. Sack und K. Conrad (2009) Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEP-2 cells. *Autoimmun Rev.* 9, 17-22.
- Higgins, J., C. Hohn, S. Hornor, M. Frana, M. Denver und R. Joerger (2007) Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *J Microbiol Methods.* 70, 227-235.
- Higgins, J. A., K. T. Belt, J. S. Karns, J. Russell-Anelli und D. R. Shelton (2005) tir- and stx-positive *Escherichia coli* in stream waters in a metropolitan area. *Appl Environ Microbiol.* 71, 2511-2519.
- Hooper, L. V., T. Midtvedt und J. I. Gordon (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 22, 283-307.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk und J. I. Gordon (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science.* 291, 881-884.
- Hopkins, M. J., R. Sharp und G. T. Macfarlane (2002) Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis.* 34 S12-18.
- Huang, W. M., S. J. Gibson, P. Facer, J. Gu und J. M. Polak (1983) Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. *Histochemistry.* 77, 275-279.
- Hudault, S., O. B. Spiller, B. P. Morgan und A. L. Servin (2004) Human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins that use human CD55 (decay-accelerating factor) as a receptor does not bind the rodent and pig analogues of CD55. *Infect Immun.* 72, 4859-4863.
- Huebner, C., Y. Ding, I. Petermann, C. Knapp und L. R. Ferguson (2011) The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces pathogen invasion and modulates cytokine expression in Caco-2 cells infected with Crohn's disease-associated *E. coli* LF82. *Appl Environ Microbiol.* 77, 2541-2544.
- Hultgren, S., J., S. Normark und S. Abraham, N. (1991) *Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili*, Annual Reviews, Palo Alto, CA, ETATS-UNIS
- Ishii, S., D. L. Hansen, R. E. Hicks und M. J. Sadowsky (2007a) Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environ Sci Technol.* 41, 2203-2209.
- Ishii, S., K. P. Meyer und M. J. Sadowsky (2007b) Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol.* 73, 5703-5710.
- Island, M. D., X. Cui, B. Foxman, C. F. Marrs, W. E. Stamm, A. E. Stapleton, et al. (1998) Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. *Infect Immun.* 66, 3384-3389.

- Jacobi, C. A. und P. Malfertheiner (2011) *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig Dis.* 29, 600-607.
- Janßen, T., C. Schwarz, P. Preikschat, M. Voss, H.-C. Philipp und L. H. Wieler (2001) Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol.* 291, 371-378.
- Jiang, M., M. Chen, Z. F. Guo und Z. Guo (2010) A bicarbonate cofactor modulates 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coenzyme a synthase in menaquinone biosynthesis of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 285, 30159-30169.
- Johnson, A. M., R. S. Kaushik, D. H. Francis, J. M. Fleckenstein und P. R. Hardwidge (2009a) Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. *J. Bacteriol.* 191, 178-186.
- Johnson, J., R. und T. Russo, A. (2002) *Uropathogenic Escherichia coli as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections*, University of Chicago Press, Chicago, IL, ETATS-UNIS
- Johnson, J. R. (1991) *Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection*, American Society for Microbiology, Washington, DC, ETATS-UNIS
- Johnson, J. R., N. Kaster, M. A. Kuskowski und G. V. Ling (2003) Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *J Clin Microbiol.* 41, 337-345.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, K. Owens, C. Clabots und R. S. Singer (2009b) Virulence genotypes and phylogenetic background of fluoroquinolone-resistant and susceptible *Escherichia coli* urine isolates from dogs with urinary tract infection. *Vet Microbiol.* 136, 108-114.
- Johnson, J. R., S. Miller, B. Johnston, C. Clabots und C. Debroy (2009c) Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *J Clin Microbiol.* 47, 3721-3725.
- Johnson, J. R., E. Oswald, T. T. O'Bryan, M. A. Kuskowski und L. Spanjaard (2002) Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the netherlands. *J. Infect. Dis.* 185, 774-784.
- Johnson, J. R. und T. A. Russo (2005) Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 295, 383-404.
- Johnson, J. R., A. L. Stell, P. Delavari, A. C. Murray, M. Kuskowski und W. Gaastra (2001) Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *J Infect Dis.* 183, 897-906.
- Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, *et al.* (2007) The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol.* 189, 3228-3236.
- Johnson, T. J., C. M. Logue, J. R. Johnson, M. A. Kuskowski, J. S. Sherwood, H. J. Barnes, *et al.* (2012) Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Food-borne Pathog Dis.* 9, 37-46.
- Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson und L. K. Nolan (2006) DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol.* 188, 745-758.
- Johnson, T. J., Y. Wannemuehler, S. J. Johnson, A. L. Stell, C. Doetkott, J. R. Johnson, *et al.* (2008) Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 74, 7043-7050.
- Justice, S. S., C. Hung, J. A. Theriot, D. A. Fletcher, G. G. Anderson, M. J. Footer, *et al.* (2004) Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *PNAS.* 101, 1333-1338.

- Kaper, J. B., J. P. Nataro und H. L. Mobley (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2, 123-140.
- Karch, H., P. I. Tarr und M. Bielaszewska (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* 295, 405-18.
- Katouli, M. (2010) Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran J Microbiol.* 2, 59-72.
- Kauffmann, F. (1947) The serology of the coli group. *J Immunol.* 57, 71-100.
- Kayser, F. H., E. C. Böttger, R. M. Zinkernagel, O. Haller, J. Eckert und P. Deplazes (2010) *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie, 12. Aufl., überarb. 2010* Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kelly, D. und S. Conway (2005) Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol Immunol.* 42, 895-901.
- Kenny, B., A. Abe, M. Stein und B. B. Finlay (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun.* 65, 2606-2612.
- Kesty, N. C., K. M. Mason, M. Reedy, S. E. Miller und M. J. Kuehn (2004) Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* 23, 4538-4549.
- Khan, N. A., Y. Kim, S. Shin und K. S. Kim (2007) FimH-mediated *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol.* 9, 169-178.
- Kim, K. S. (2008) Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol.* 6, 625-634.
- Kim, K. S., H. Itabashi, P. Gemski, J. Sadoff, R. L. Warren und A. S. Cross (1992) The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J Clin Invest.* 90, 897-905.
- Knippers, R. (2001) *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams und A. S. McNeish (1989) Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 57, 1290-1298.
- Knutton, S., R. K. Shaw, R. P. Anantha, M. S. Donnenberg und A. A. Zorgani (1999) The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol.* 33, 499-509.
- Kobayashi, H., M. Kanazaki, E. Hata und M. Kubo (2009) Prevalence and characteristics of *eae*- and *stx*-positive strains of *Escherichia coli* from wild birds in the immediate environment of Tokyo Bay. *Appl Environ Microbiol.* 75, 292-295.
- Kobayashi, R. K., L. C. Gaziri und M. C. Vidotto (2010) Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains. *J Vet Sci.* 2010 Dec;11(4):315-9.
- Koh, S. Y., S. George, V. Brozel, R. Moxley, D. Francis und R. S. Kaushik (2008) Porcine intestinal epithelial cell lines as a new *in vitro* model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 130, 191-197.
- Kolling, G. L. und K. R. Matthews (1999) Export of virulence genes and shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 65, 1843-1848.
- Kong, M. K. und P. C. Lee (2011) *Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of Escherichia coli as a microbial platform for vitamin K production*, Biotechnol Bioeng.
- Korhonen, T. K., V. Vaisanen-Rhen, M. Rhen, A. Pere, J. Parkkinen und J. Finne (1984) *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. *J Bacteriol.* 159, 762-766.
- Kostakioti, M. und C. Stathopoulos (2004) Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun.* 72, 5548-5554.
- Kraemer, B. F., R. A. Campbell, H. Schwertz, Z. G. Franks, A. Vieira de Abreu, K. Grundler, et al. (2012) Bacteria differentially induce degradation of Bcl xL, a survival protein, by human platelets. *Blood.* 120, 5014-5020.

- Krag, L., V. Hancock, B. Aalbæk und P. Klemm (2009) Genotypic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis. *Vet Microbiol.* 134, 318-326.
- Kuehn, M. J., J. Heuser, S. Normark und S. J. Hultgren (1992) P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature.* 356, 252-255.
- Lalioui, L., M. Jouve, P. Gounon und C. Le Bouguenec (1999) Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect Immun.* 67, 5048-5059.
- Landraud, L., M. Gibert, M. R. Popoff, P. Boquet und M. Gauthier (2003) Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol.* 47, 1653-1667.
- Lane, M. C. und H. L. Mobley (2007) Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* 72, 19-25.
- Lasaro, M. A., N. Salinger, J. Zhang, Y. Wang, Z. Zhong, M. Goulian, *et al.* (2009) F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Appl Environ Microbiol.* 75, 246-251.
- Lauber, C. L., L. Glatzer und R. L. Sinsabaugh (2003) Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in recreational waters. *J Great Lakes Res.* 29, 301-306.
- Le Bouguénec, C. und A. L. Servin (2006) Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 256, 185-194.
- Lee, C. A. und S. Falkow (1990) The ability of Salmonella to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *PNAS.* 87, 4304-4308.
- Lehmann, W., A. Böhm, K. Grossmann, R. Hiemann, J. Nitschke und S. Rödiger (2008) Method for carrying out and evaluating mix & measure assays for the measurement of reaction kinetics, concentrations and affinities of analytes in multiplex format. Patent: *Publication number: US 2010/0203572 A1* <http://ip.com/patapp/US20100203572>
- Leung, C. Y., Y. C. Chan, L. P. Samaranayake und C. J. Seneviratne (2012) Biocide resistance of *Candida* and *Escherichia coli* biofilms is associated with higher antioxidative capacities. *J. Hosp. Infect.* 81, 79-86.
- Levine, M. M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* 155, 377-389.
- Lievin-Le Moal, V. und A. L. Servin (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 19, 315-337.
- Mack, D. R. und S. Lebel (2004) Role of probiotics in the modulation of intestinal infections and inflammation. *Curr Opin Gastroenterol.* 20, 22-26.
- Mackie, R. I., A. Sghir und H. R. Gaskins (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 69, 035S-1045S.
- Macpherson, A. J., M. B. Geuking und K. D. McCoy (2005) Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology.* 115, 153-162.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, T. D. Brock und M. Thomm (2006) *Brock - Mikrobiologie*, Pearson Studium, München
- Mainil, J. G. und G. Daube (2005) Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol.* 98, 1332-1344.
- Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 437, 376-380.
- Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner und S. J. Hultgren (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 19, 2803-2812.

- Martínez, R., A. García, J. Blanco, J. Blanco, J. Rey, J. Alonso, *et al.* (2011) Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in the faeces of free-ranging wild lagomorphs in southwest Spain. *Eur J Wildlife Res.* 57, 187-189.
- Merlino, J., S. Siarakas, G. J. Robertson, G. R. Funnell, T. Gottlieb und R. Bradbury (1996) Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol.* 34, 1788-93.
- Meyer-Hoffert, U., M. W. Hornef, B. Henriques-Normark, L. G. Axelsson, T. Midtvedt, K. Putsep, *et al.* (2008) Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut.* 57, 764-771.
- Mills, Melody, Meysick, C. Karen, O'Brien und D. Alison (2000) *Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic Escherichia coli kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism*, American Society for Microbiology, Washington, DC, ETATS-UNIS
- Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockatell, *et al.* (1990) Pylonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun.* 58, 1281-1289.
- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine und R. A. Giannella (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun.* 41, 1340-1351.
- Moore, W. E. und L. H. Moore (1995) Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol.* 61, 3202-3207.
- Mora, A., A. Herrera, R. Mamani, C. Lopez, M. P. Alonso, J. E. Blanco, *et al.* (2010) Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol.* 76, 6991-6997.
- Mora, A., C. Lopez, G. Dabhi, M. Blanco, J. E. Blanco, M. P. Alonso, *et al.* (2009) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol.* 7, 132.
- Moreno, E., A. Andreu, T. Perez, M. Sabate, J. R. Johnson und G. Prats (2006) Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiol Infect.* 134, 1015-1023.
- Moreno, E., A. Andreu, C. Pigrau, M. A. Kuskowski, J. R. Johnson und G. Prats (2008) Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J Clin Microbiol.* 46, 2529-2534.
- Moreno, E., J. R. Johnson, T. Perez, G. Prats, M. A. Kuskowski und A. Andreu (2009) Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes Infect.* 11, 274-280.
- Mounier, J., T. Vasselon, R. Hellio, M. Lesourd und P. J. Sansonetti (1992) *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infect Immun.* 60, 237-248.
- Moxley, R. A., E. M. Berberov, D. H. Francis, J. Xing, M. Moayeri, R. A. Welch, *et al.* (1998) Pathogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* hemolysin (*hlyA*) mutant in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 66, 5031-5035.
- Mundy, R., S. Schuller, F. Girard, J. M. Fairbrother, A. D. Phillips und G. Frankel (2007) Functional studies of intimin *in vivo* and *ex vivo*: implications for host specificity and tissue tropism. *Microbiology.* 153, 959-967.
- Nagy, B. und P. Z. Fekete (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res.* 30, 259-284.
- Nagy, B. und P. Z. Fekete (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 295, 443-454.
- Nataro, J. P. und J. B. Kaper (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11, 142-201.
- Nataro, J. P., J. B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. Vial und M. M. Levine (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J.* 6, 829-31.

- Noris, M. und G. Remuzzi (2005) Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 16, 1035-1050.
- Nowrouzian, F., B. Hesselmar, R. Saalman, I. L. Strannegard, N. Aberg, A. E. Wold, *et al.* (2003) *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res.* 54, 8-14.
- Nowrouzian, F. L., I. Adlerberth und A. E. Wold (2006) Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect.* 8, 834-840.
- O'Hanley, P., G. Lalonde und G. Ji (1991) Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. *Infect Immun.* 59, 1153-1161.
- Obwegeser, T., R. Stephan, E. Hofer und C. Zweifel (2012) Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of hunted wild ruminants. *Vet Microbiol.* 159, 149-154.
- Oh, J. Y., M. S. Kang, H. T. Hwang, B. K. An, J. H. Kwon und Y. K. Kwon (2011) Epidemiological investigation of *eaeA*-positive *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* strains isolated from healthy wild birds. *J Microbiol.* 49, 747-752.
- Ott, M., J. Hacker, T. Schmoll, T. Jarchau, T. K. Korhonen und W. Goebel (1986) Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (*sfa*) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections. *Infect Immun.* 54, 646-653.
- Ott, M., H. Hoschutzky, K. Jann, I. Van Die und J. Hacker (1988) Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) and F1C fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. *J Bacteriol.* 170, 3983-3990.
- Pallen, M. J. und B. W. Wren (2007) Bacterial pathogenomics. *Nature.* 449, 835-842.
- Phillips, A. D., J. Giron, S. Hicks, G. Dougan und G. Frankel (2000) Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. *Microbiology.* 146, 1333-1344.
- Pizarro-Cerdá, J. und P. Cossart (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 124, 715-727.
- Power, E. G. M. (1996) RAPD typing in microbiology—a technical review. *J Hosp Infect.* 34, 247-265.
- Prasadarao, N. V. (2002) Identification of *Escherichia coli* outer membrane protein A receptor on human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* 70, 4556-4563.
- Provence, D. L. und R. Curtiss, 3rd (1994) Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun.* 62, 1369-1380.
- Pruimboom-Brees, I. M., T. W. Morgan, M. R. Ackermann, E. D. Nystrom, J. E. Samuel, N. A. Cornick, *et al.* (2000) Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxins. *PNAS.* 97, 10325-10329.
- Rabatsky-Ehr, T., D. Dingman, R. Marcus, R. Howard, A. Kinney und P. Mshar (2002) Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut. *Emerg Infect Dis.* 8, 525-527.
- Ramzan, N. N. (2001) Traveler's diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am.* 30, 665-678.
- Reece, S., C. P. Simmons, R. J. Fitzhenry, S. Matthews, A. D. Phillips, G. Dougan, *et al.* (2001) Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity. *Mol Microbiol.* 40, 86-98.
- Renter, D. G., J. M. Sargeant, S. E. Hygnstorm, J. D. Hoffman und Gillespie (2001) *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. *J Wildl Dis.* 37, 755-760.
- Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, *et al.* (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease.* 3, 59-67.
- Riley, M. A. und J. E. Wertz (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.* 56, 117-137.

- Robins-Browne, R. M., A. M. Bordun, M. Tauschek, V. R. Bennett-Wood, J. Russell, F. Oppedisano, *et al.* (2004) *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg Infect Dis.* 10, 1797-1805.
- Robins-Browne, R. M., A. M. Tokhi, L. M. Adams und V. Bennett-Wood (1994) Host specificity of enteropathogenic *Escherichia coli* from rabbits: lack of correlation between adherence *in vitro* and pathogenicity for laboratory animals. *Infect Immun.* 62, 3329-3336.
- Rocha, S. P., C. M. Abe, V. Sperandio, S. Y. Bando und W. P. Elias (2011) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. *Infect Immun.* 79, 1833-1841.
- Rödiger, S., T. Friedrichsmeier, P. Kapat und M. Michalke (2012a) Rkward: A comprehensive graphical user interface and integrated development environment for statistical analysis with R. *J Stat Software.* 49, 1-34.
- Rödiger, S., M. Ruhland, C. Schmidt, C. Schröder, K. Grossmann, A. Böhm, *et al.* (2011) Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads. *Anal Chem.* 83, 3379-3385.
- Rödiger, S., P. Schierack, A. Böhm, J. Nitschke, I. Berger, U. Frömmel, *et al.* (2012b) A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules and autoimmune antibodies. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2012 Mar 23. ISSN 1616-8542.
- Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, M. K. Fakhr und L. K. Nolan (2005) Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology.* 151, 2097-2110.
- Römer, A., L. H. Wieler und P. Schierack (2012) Analyses of intestinal commensal *Escherichia coli* strains from wild boars suggest adaptation to conventional pig production conditions. *Vet. Microbiol.*
- Round, J. L. und S. K. Mazmanian (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9, 313-23.
- Russo, T. A., B. A. Davidson, S. A. Genagon, N. M. Warholc, U. Macdonald, P. D. Pawlicki, *et al.* (2005) *E. coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis *in vitro* and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289, L207-216.
- Russo, T. A. und J. R. Johnson (2000) *Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC*, University of Chicago Press, Chicago, IL, ETATS-UNIS
- Russo, T. A. und J. R. Johnson (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5, 449-456.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto und T. Mattila-Sandholm (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* 84, 197-215.
- Sanchez, S., A. Garcia-Sanchez, R. Martinez, J. Blanco, J. E. Blanco, M. Blanco, *et al.* (2009) Detection and characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. *Vet. J.* 180, 384-388.
- Sansonetti, P. J. (2006) The bacterial weaponry: lessons from Shigella. *Ann N Y Acad Sci.* 1072, 307-312.
- Savage, D. C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 31, 107-133.
- Scaletsky, I. C. A., K. R. S. Aranda, T. B. Souza und N. P. Silva (2010) Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol.* 48, 302-306.
- Schaible, U. E. und S. H. E. Kaufmann (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Micro.* 2, 946-953.
- Schierack, P. (2010) Neue Aspekte zu intestinalen Enterobacteriaceae-Populationen beim Schwein. *Habilitationsschrift*, pp 121, FU Berlin.

- Schierack, P., S. Kleta, K. Tedin, J. T. Babila, S. Oswald, T. A. Oelschlaeger, *et al.* (2011) *E. coli* Nissle 1917 affects Salmonella adhesion to porcine intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 6, e14712.
- Schierack, P., A. Römer, J. Jores, H. Kaspar, S. Guenther, M. Filter, *et al.* (2009) Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Appl Environ Microbiol.* 75, 695-702.
- Schierack, P., H. Steinrueck, S. Kleta und W. Vahjen (2006) Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy Pigs. *Appl Environ Microbiol.* 72, 6680-6686.
- Schierack, P., N. Walk, C. Ewers, H. Wilking, H. Steinrueck, M. Filter, *et al.* (2008) ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Environ Microbiol.* 10, 1742-1751.
- Schierack, P., N. Walk, K. Reiter, K. D. Weyrauch und L. H. Wieler (2007) Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology.* 153, 3830-3837.
- Schlager, T. A., J. O. Hendley, A. L. Bell und T. S. Whittam (2002) Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect Immun.* 70, 1225-1229.
- Schmidt, M. A. (2010) LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol.* 12, 1544-1552.
- Schubert, S., A. Rakin, H. Karch, E. Carniel und J. Heesemann (1998) Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* 66, 480-5.
- Schüller, S. (2011) Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins.* 3, 626-639.
- Schumacher, S., J. Nestler, T. Otto, M. Wegener, E. Ehrentreich-Forster, D. Michel, *et al.* (2012) Highly-integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis. *Lab Chip.* 12, 464-473.
- Sears, C. L. und J. B. Kaper (1996) Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev.* 60, 167-215.
- Seetharama, S., S. J. Cavalieri und I. S. Snyder (1988) Immune response to *Escherichia coli* alpha-hemolysin in patients. *J Clin Microbiol.* 26, 850-856.
- Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour und T. S. Whittam (1986) *Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics*, American Society for Microbiology, Washington, DC, ETATS-UNIS
- Servin, A. L. (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 28, 405-440.
- Servin, A. L. (2005) Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 18, 264-292.
- Sheldon, I. M., A. N. Rycroft, B. Dogan, M. Craven, J. J. Bromfield, A. Chandler, *et al.* (2010) Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One.* 5, e9192.
- Skurnik, D., D. Bonnet, C. Bernede-Bauduin, R. Michel, C. Guette, J. M. Becker, *et al.* (2008) Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ Microbiol.* 10, 2132-2137.
- Smith, H. W. (1963) The haemolysins of *Escherichia coli*. *J Pathol Bacteriol.* 85.
- Smith, H. W. und M. A. Linggood (1971) Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J Med Microbiol.* 4, 467-485.
- Smith, J. L., P. M. Fratamico und N. W. Gunther (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 4, 134-163.
- Smith, Y. C., K. K. Grande, S. B. Rasmussen und A. D. O'Brien (2006) Novel three-dimensional organoid model for evaluation of the interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with terminally differentiated human urothelial cells. *Infect Immun.* 74, 750-757.
- Smith, Y. C., S. B. Rasmussen, K. K. Grande, R. M. Conran und A. D. O'Brien (2008) Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage

- in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun.* 76, 2978-2990.
- Snyder, J. A., B. J. Haugen, C. V. Lockett, N. Maroncle, E. C. Hagan, D. E. Johnson, *et al.* (2005) Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 73, 7588-7596.
- Sonntag, A. K., M. Bielaszewska, A. Mellmann, N. Dierksen, P. Schierack, L. H. Wieler, *et al.* (2005) Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 71, 8855-8863.
- Souza, V., M. Rocha, A. Valera und L. E. Eguiarte (1999) Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol.* 65, 3373-3385.
- Stanley, T. und I. Wilson (2003) Multilocus enzyme electrophoresis. *Mol Biotechnol.* 24, 203-220.
- Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper und J. I. Gordon (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS.* 99, 15451-15455.
- Taylor, S., S. Smith, B. Windle und A. Guiseppi-Elie (2003) Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 31, e87.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard und E. Denamur (2010) The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Micro.* 8, 207-217.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, *et al.* (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33, 2233-2239.
- Thapar, N. und I. R. Sanderson (2004) Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *Lancet.* 363, 641-653.
- Tivendale, K. A., J. L. Allen, C. A. Ginns, B. S. Crabb und G. F. Browning (2004) Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 72, 6554-6560.
- Tobe, T., T. Hayashi, C. G. Han, G. K. Schoolnik, E. Ohtsubo und C. Sasakawa (1999) Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect Immun.* 67, 5455-5462.
- Tobe, T. und C. Sasakawa (2001) Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. *Cell Microbiol.* 3, 579-585.
- Torres, A. G., X. Zhou und J. B. Kaper (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun.* 73, 18-29.
- Touchon, M., C. Hoede, O. Tenaillon, V. Barbe, S. Baeriswyl, P. Bidet, *et al.* (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5, e1000344.
- Trabulsi, L. R., R. Keller und T. A. Tardelli Gomes (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 8, 508-513.
- Troeger, H., J. F. Richter, L. Beutin, D. Gunzel, U. Dobrindt, H. J. Epple, *et al.* (2007) *Escherichia coli* alpha-haemolysin induces focal leaks in colonic epithelium: a novel mechanism of bacterial translocation. *Cell Microbiol.* 9, 2530-2540.
- Ukena, S. N., A. Singh, U. Dringenberg, R. Engelhardt, U. Seidler, W. Hansen, *et al.* (2007) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 2, e1308.
- Vejborg, R. M. und P. Klemm (2009) Cellular chain formation in *Escherichia coli* biofilms. *Microbiology.* 155, 1407-1417.
- Vidal, M., E. Kruger, C. Duran, R. Lagos, M. Levine, V. Prado, *et al.* (2005) Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol.* 43, 5362-5365.
- Virkola, R., B. Westerlund, H. Holthofer, J. Parkkinen, M. Kekomaki und T. K. Korhonen (1988) Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. *Infect Immun.* 56, 2615-2622.

- Walk, S. T., E. W. Alm, L. M. Calhoun, J. M. Mladonicky und T. S. Whittam (2007) Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ Microbiol.* 9, 2274-2288.
- Wallace, J., Y. Zhou, G. N. Usmani, M. Reardon, P. Newburger, B. Woda, et al. (2003) BARCODE-ALL: accelerated and cost-effective genetic risk stratification in acute leukemia using spectrally addressable liquid bead microarrays. *Leukemia.* 17, 1411-1413.
- Walton, J. R. und D. H. Smith (1969) New hemolysin (gamma) produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 98, 304-305.
- Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes und A. D. O'Brien (1988) Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol.* 170, 4223-4230.
- Welch, R. A. (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 5, 521-528.
- White, A. P., K. A. Sibley, C. D. Sibley, J. D. Wasmuth, R. Schaefer, M. G. Surette, et al. (2011) Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. *Appl Environ Microbiol.* 77, 7620-7632.
- Wiles, T. J., B. K. Dhakal, D. S. Eto und M. A. Mulvey (2008a) Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell.* 19, 1427-1438.
- Wiles, T. J., R. R. Kulesus und M. A. Mulvey (2008b) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 85, 11-19.
- Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, et al. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 60, 1136-1151.
- Wold, A. E., D. A. Caugant, G. Lidin-Janson, P. de Man und C. Svanborg (1992) Resident colonic *Escherichia coli* strains frequently display uropathogenic characteristics. *J Infect Dis.* 165, 46-52.
- Yamamoto, S., T. Tsukamoto, A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda und O. Yoshida (1997) Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol.* 157, 1127-1129.
- Yin, X., Y. Feng, R. Wheatcroft, J. Chambers, J. Gong und C. L. Gyles (2011) Adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to epithelial cells *in vitro* and in pig gut loops is affected by bacterial culture conditions. *Can J Vet Res.* 75, 81-88.
- Yokoyama, K., T. Horii, T. Yamashino, S. Hashikawa, S. Barua, T. Hasegawa, et al. (2000) Production of shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins. *FEMS Microbiol Lett.* 192, 139-144.
- Yoon, J. W. und C. J. Hovde (2008) All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Vet Sci.* 9, 219-231.
- Zhou, G., W.-J. Mo, P. Sebbel, G. Min, T. A. Neubert, R. Glockshuber, et al. (2001) Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from *in vitro* FimH binding. *J Cell Sci.* 114, 4095-4103.
- Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Sonnenberg, M. Beaudry, et al. (1994) Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun.* 62, 4153-4159.
- Zschüttig, A., K. Zimmermann, J. Blom, A. Goesmann, C. Pöhlmann und F. Gunzer (2012) Identification and characterization of microcin S, a new antibacterial peptide produced by probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLoS One.* 7, e33351.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Adenin
AA	aggregative Adhäsion
AAF	aggregative Adhäsionsfimbrien
AGE	Agarosegelelektrophorese
BFB	<i>bundle forming pilus</i>
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CEA	<i>human carcinoembryonic antigens</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen related cellular adhesion molecules</i>
DAEC	diffus adhätierende <i>Escherichia coli</i>
DAF	<i>human decay-accelerating factor</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EAF	Adhärenz Faktor Plasmid (EPEC)
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
exVAG	virulenzassoziiertes Gen in Assoziation zu extraintestinaler Pathogenität
G	Guanin
h	Stunde
HC	Hämorrhagische Colitis
HUS	hämorrhagisch-urämisches Syndrom
IHYT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
IMIB	Institut für molekulare Infektionsbiologie
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin
inVAG	virulenzassoziiertes Gen in Assoziation zu intestinaler Pathogenität
LB	Luria Bertani-Medium
min	Minunte
MOI	Multiplizität der Infektion
MPMA	Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay
MW	Mittelwert
NFSTC	National Food Safety and Toxicology Center-Michigan State University
PAI	Pathogenitätsinsel
rpm	<i>round per minute</i>
STEC	shigatoxinproduzierende <i>Escherichia coli</i>
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur

8.2 Tabellen

Tab. 1	Virulenzassoziierte Gene (VAGs) von <i>E. coli</i>	10
Tab. 2	Einteilung der DAEC in Subklassen nach Adhäsionsfaktoren und Rezeptoren.....	14
Tab. 3	<i>E. coli</i> -Isolate.....	21
Tab. 4	<i>E. coli</i> -Stämme als Kontrollen für Adhäsionsassays.....	21
Tab. 5	Kontrollstämme für PCRs.....	22
Tab. 6	Sequenzen der Oligonukleotide, PCR-Fragmentlänge, Accession-Nr., Quelle und PCR-Programme..	22
Tab. 7	Zelllinien, deren Ursprung, Gewebeart und Anwendung innerhalb dieser Arbeit	25

Tab. 8	Standardpuffer und Lösungen	26
Tab. 9	Zellkulturmedien	26
Tab. 10	Nähr- und Selektivmedien für Bakterienkulturen	26
Tab. 11	Enzyme, Farbstoffe, Größenmarker, Chemikalien	26
Tab. 12	Verbrauchsmaterial und Kits	27
Tab. 13	Geräte für allgemeine Laborarbeit und für die Mikroskopie.....	27
Tab. 14	Reaktionsansätze für Standard-Einzel-PCRs und die mPCRs des MPMA.....	32
Tab. 15	Einstufung der Adhäsionsrate in Abhängigkeit der Anzahl adhärenter Stämme pro mm ²	35
Tab. 16	Anzahl der Zellen konfluenter Monolayer pro Well einer 96-Well-Platte.....	38
Tab. 17	Arbeitsschritte des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays.....	42
Tab. 18	Prävalenz der VAGs in nicht hämolytischen und hämolytischen Isolaten in Abhängigkeit der Art.....	45
Tab. 19	Phylogenie der Isolate nicht hämolytischer und hämolytischer <i>E. coli</i> in Abhängigkeit der Art.....	47
Tab. 20	Zuordnung der nicht hämolytischen und hämolytischen <i>E. coli</i> -Isolate zu Pathotypen	49
Tab. 21	Prävalenz der Virulenzfaktorgruppen in hämolytischen und nicht hämolytischen <i>E. coli</i> -Isolaten	50
Tab. 22	Adhäsionsrate der nicht hämolytischen <i>E. coli</i> in Abhängigkeit der Phylogenie auf vier Zelllinien	57
Tab. 23	Zelllinien-, gewebe-, wirts- und unspezifische Adhäsionsmusterbildung der <i>E. coli</i> -Isolate.....	58
Tab. 24	Adhäsionsmusterbildung von <i>E. coli</i> nach Wirtsarten unterteilt.....	59
Tab. 25	Zytotoxizität hämolytischer <i>E. coli</i> auf vier Zelllinien zu jeweils zwei Messzeitpunkten	63

8.3 Abbildungen

Abb. 1	Schema für die Ermittlung der Schwellwerte des MPMA	32
Abb. 2	Klassifizierung von 18 Mikropartikelpopulationen.....	37
Abb. 3	Schematische Darstellung des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays	41
Abb. 4	Reproduzierbarkeit des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays.....	43
Abb. 5	Detektionslimit des Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assays	43
Abb. 6	Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Fluoreszenzintensität	44
Abb. 7	eVAGs in nicht hämolytischen <i>E. coli</i> -Isolaten.....	46
Abb. 8	eVAGs in hämolytischen <i>E. coli</i> -Isolaten.....	48
Abb. 9	Schematische Darstellung des Adhäsionsassays	51
Abb. 10	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien Caco-2, 5637, IPEC-J2 und PK-15	52
Abb. 11	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien 5637 und IPEC-J2.....	52
Abb. 12	Detektion adhärenter <i>E. coli</i> -Isolate auf IPEC-J2-Zellen	53
Abb. 13	Anzahl der jeweils nicht, schwach, mittel und stark adhärenter <i>E. coli</i> -Isolate auf vier Zelllinien	54
Abb. 14	Anzahl der zelllinien-, gewebe-, wirts- und unspezifisch adhärenter <i>E. coli</i> -Isolate.....	55
Abb. 15	Wirtsartenspezifisches Adhäsionsverhalten der <i>E. coli</i> -Isolate	56
Abb. 16	Adhäsionsmuster der <i>E. coli</i> -Isolate	57
Abb. 17	Kettenbildung eines <i>E. coli</i> -Isolates einer Amsel.....	59
Abb. 18	Adhäsionsmuster von vierzehn <i>eaeA</i> ⁺ <i>E. coli</i> -Isolaten.....	60
Abb. 19	Epithelzellen nach Inkubation mit einem hämolytischen <i>E. coli</i> -Isolat aus einem Hausschwein.....	62

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der InnoProfile-Nachwuchsforschergruppe „Neue Technologien für die molekulare Diagnostik“ in der Fakultät für Naturwissenschaften der Hochschule Lausitz (FH) in Senftenberg angefertigt. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Peter Schierack für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation und der Möglichkeit zur Arbeit am Institut. Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Frank F. Bier vom Fraunhofer IBMT für die externe Betreuung. Ich profitierte von der regelmäßigen Anfertigung der Quartalsberichte die mir halfen, meine Arbeit zu strukturieren.

Besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe sowie dem weiteren Arbeitsumfeld für die wissenschaftliche Beratung und die Anteilnahme während der gesamten Zeit der Promotionsarbeit. Hervorzuheben sind diesbezüglich die Informatiker Alexander Böhm und Jörg Nitschke. Sie entwickelten die Basissoftware, welche die Grundlage der gesamten Messungen und Ergebnisse dieser Arbeit ist. Ohne ihr Engagement, ihre schnelle Umsetzung von Ideen, ihre hilfreichen Anregungen, ihr Verständnis und die kritischen Diskussionen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich bei Stefan Rödiger für die Einführung in die Arbeit mit Mikropartikeln und besonders für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der umfangreichen Datensätze, die während dieser Arbeit erstellt wurden. Jörg Weinreich danke ich sehr für die freundliche Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit. Ingo Berger danke ich für angenehme Gespräche, seine Hilfe bei der Datenstrukturierung und die Erstellung vieler Graphiken, die meine Veröffentlichungen und Poster zieren. Mein Dank gilt zudem Dr. Rico Hiemann für die Adaption der AKLIDES®-Technologie zur Detektion von Zellmonolayern. Hugo Mildenerger danke ich für das Erstellen der Datenbank und Diskussionen über Statistik. Dr. Stefanie Barth danke ich für die unkomplizierte Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Phylogenie.

Für die Mitarbeit beim Erstellen der Publikationen sowie der Korrektur der Dissertationsschrift bedanke ich mich bei Prof. Dr. Peter Schierack. Bei allen meinen Kollegen bedanke ich mich für regelmäßige Korrekturen, konstruktive Kritik und Anregungen bezüglich meiner praktischen Arbeiten, meiner Vorträge, meiner Manuskripte und Poster. Für die kritische, anregende und sorgfältige fachliche Kontrolle dieser Dissertationsschrift bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Studienfreundinnen Anne Rother und Carmen Sperlich. Ihre Diskussionen halfen mir außerordentlich, Stringenz in die schriftliche Arbeit zu bringen. Meiner Schwägerin Antje Böhme danke ich für die Korrektur der Rechtschreibung, der Grammatik und der Kommasetzung dieser Dissertationsschrift.

Ich danke meinem besten Freund für die unermüdliche Unterstützung und Motivation. Daraus habe ich Mut, Kraft und Selbstvertrauen geschöpft. Der größte Dank gilt jedoch meiner Mutter, die immer auf jede erdenkliche Weise hinter mir steht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Ferner versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Ulrike Frömmel

Dresden, April 2013