

Die Multiplex-PCR ermöglicht erstmals den spezifischen und sensitiven Nachweis von aviären pathogenen *Escherichia coli* (APEC)

Traute Janßen¹, Dr. Hans-C. Philipp², Dr. Matthias Voß², Prof. Rudolph Preisinger² und Prof. Lothar H. Wieler¹

(¹Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin,
²Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven)

Einleitung

Infektionen mit aviären pathogenen *E. coli* (APEC) verursachen das Krankheitsbild der Kolibazillose, einer akuten Erkrankung des Geflügels, die sowohl lokale als auch systemische Infektionen umfasst und sich in einer Vielzahl unterschiedlicher Organveränderungen äußert. Betroffen sind vor allem der Respirationstrakt (Lunge, Luftsäcke), welcher den APEC als Eintrittspforte dient, sowie im weiteren Verlauf u. a. die serösen Überzüge der inneren Organe, Bauchfell, Eileiter, Hirnhäute und Gelenke. Die entzündlichen Veränderungen an diesen Organen führen in der Regel innerhalb kürzester Zeit zum Tod des Tieres. Die Kolibazillose verursacht weltweit erhebliche wirtschaftliche Verluste (BARNES und GROSS, 1999). Damit es zum Ausbruch der Erkrankung kommt, spielen neben den APEC auch Umweltbedingungen (Stallverhältnisse, kontaminiertes Futter/Trinkwasser, erhöhte Besatzdichte) und die Empfänglichkeit des Wirtes (Immunsuppression, Stress, Verletzungen u. a.) eine Rolle (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999). Dies wurde in einem vorherigen Beitrag von Dr. Philipp und Dr. Voss in der Ausgabe 2/2001 der LOHMANN INFORMATION bereits erläutert (PHILIPP und VOß, 2001).

Die meisten aviären *E. coli*-Isolate sind normale Bewohner der intestinalen Mikroflora des Geflügels und finden sich somit auch in der Umgebung der Vögel. Diese Isolate haben wichtige Stoffwechselfunktionen für den Wirt und sind apathogen. Aufgrund des Austausches von Genmaterial können jedoch aus diesen apathogenen Bakterien pathogene werden, wenn das hinzugewonnene Genmaterial für spezifische Virulenzfaktoren kodiert. Solche Isolate sind dann in der Lage, Erkrankungen aus dem Symptomenkomplex der Kolibazillose auszulösen. Als Erreger werden am häufigsten Stämme der Serovare O1:K1, O2:K1 und O78:K80 nachgewiesen, und zwar in bis zu 61 % der untersuchten Isolate (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999; PHILIPP und VOß, 2001). Allerdings bedeutet dies, dass immerhin mindestens 40 % der Isolate bei der immer noch gängigen Diagnostik mittels Serotypisierung schlichtweg unerkannt bleiben, da sie mit den o. g. Serovaren nicht erfasst werden. Nach wie vor ist jedoch die Serotypisierung eines der am häufigsten angewendeten diagnostischen Werkzeuge, um aviäre *E. coli*-Wildtypstämme als APEC-Stämme zu identifizieren. Diese mangelnde diagnostische Aussagekraft durch die Verwendung von agglutinierenden Seren stellt eine nicht akzeptable diagnostische Lücke dar.

Deshalb bieten sich genotypische Methoden zum Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren von APEC an, um aviäre pathogene *E. coli* zweifelsfrei zu identifizieren. Eine eindeutige Identifizierung der APEC ist unbedingte Voraussetzung, um weitere Erkenntnisse über die Bedeutung der Virulenzfaktoren in der Pathogenese der Kolibazillose zu erhalten. Es ist immer noch relativ wenig darüber bekannt, welche exakten bakteriellen Eigenschaften in diesem Krankheitsgeschehen eine Rolle spielen. Allerdings konnten in jüngster Zeit mithilfe von Infektionsversuchen Zusammenhänge zwischen einzelnen Faktoren und der Vi-

ruenz geklärt werden. Diese Virulenzfaktoren ermöglichen den aviären pathogenen *E. coli* die Anheftung an das Epithel des Respirationstraktes, ihre Vermehrung und Ausbreitung im Wirt, das Ausbilden von Resistenzen gegenüber Abwehrmechanismen des Wirtes, Manifestationen in den Organen sowie das Erzeugen von zytopathischen Effekten. Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bislang identifizierten potenziellen Virulenzfaktoren von APEC-Isolaten, die prinzipiell als Zielgene für die Bestimmung von APEC dienen können.

Fimbrien sind faserartige Strukturen, die sich mithilfe eines Elektronenmikroskops auf der Oberfläche zahlreicher Bakterien erkennen lassen. Eine Bedeutung in der Pathogenese der Kolibazillose schreibt man den F1-Fimbrien, den P-Fimbrien sowie den Curli zu. F1-Fimbrien werden von zahlreichen Enterobakterien, sowohl pathogenen als auch apathogenen, exprimiert, allerdings belegen diverse Studien, dass aviäre pathogene *E. coli* diese weitaus häufiger exprimieren als apathogene Isolate (DOZOIS et al., 1992 / WOOLEY et al., 1992). F1-Fimbrien ermöglichen den APEC-Isolaten die Anheftung an die Epithelzellen des Respirationstraktes (Trachea, Lunge und Luftsäcke). Des Weiteren scheinen sie in der Lage zu sein, die *E. coli*-Stämme vor den bakteriziden Wirkungen des Wirtes zu schützen (ORNDORFF, 1994). P-Fimbrien wiederum lassen sich auch häufig bei *E. coli*-Isolaten nachweisen, die extraintestinale Infektionen vor allem der oberen Harnwege bei Mensch und Hund sowie Septikämien beim Schwein verursachen (JOHNSON et al., 2000).

Tabelle 1: Virulenzfaktoren aviärer pathogener *E. coli*

Virulenzfaktor	Bedeutung in der Pathogenese
Fimbrien	
> F1 (Typ1) Fimbrien	- Anheftung an die Epithelzellen des Respirationstraktes
> P-Fimbrien	- Anheftung an innere Organe
> Curli	- Schutz vor Phagozytose
Eisenaquirierende Systeme	
> Aerobactin	- Eisenzug vom Wirt
> Yersinabactin	- Wachstum und rasche Vermehrung
Hämolysine	nur tsh
> Hämolysin E	- Entwicklung von Läsionen und Fibrinablagerungen im Luftsack
> Temperatur-sensitives Hämagglutinin (tsh)	- Zerstörung der Erythrozyten
Anti-Wirtsabwehrsysteme	
> Äußere Membranproteine	- Schutz vor bakteriziden Wirkungen des Wirtes in der Blutbahn, v. a. durch Hemmung des Komplementbindungssystems
> Iss-Protein	
> Lipopolysaccharid-Komplex	
> K (1) Kapsel	
> ColicinV-Produktion	
Toxine und Cytotoxine	
> Hitze-stabiles Toxin (EAST-1)	- noch weitestgehend ungeklärt, wahrscheinlich schädigende Wirkung auf Stoffwechselforgänge in der Zelle
> Shiga-Toxin (Stx2f)	
> Cytotoxin (Verotoxin)	
> Flagellar-Toxin	- Vakuolisierung der Zellen

Mittels Infektionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass diese Fimbrien ebenfalls von aviären pathogenen *E. coli*, isoliert aus Lunge und Luftsäcken sowie den inneren Organen, nicht aber aus der Trachea, exprimiert werden (DOZOIS et al., 1994; van den BOSCH et al., 1993; VIDOTTO et al., 1997). Auch scheinen sie in der Lage zu sein, APEC-Isolate vor Phagozytose zu schützen (POURBAKHS et al., 1997 und 1997a). Die Rolle der Curli-Fasern in der Pathogenese ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass sie zur bakteriellen Adhärenz und Besiedlung vor allem im Anfangsstadium der Infektion beitragen (MAURER et al., 1998; OLSEN et al., 1998).

Mithilfe der Siderophoren Aerobactin und Yersiniabactin sind Mikroorganismen in der Lage, dem Wirt das essenzielle, also lebensnotwendige Eisen zu entziehen, welches die Bakterien für ihr Wachstum und ihre Vermehrung benötigen. Ohne Siderophore wären Bakterien nicht in der Lage, im Wirt zu überleben, da die Konzentration des frei verfügbaren Eisens in den Körperflüssigkeiten von Tieren oder Menschen nur sehr gering ist (CHIPPERFIELD et al., 2000). Zahlreiche Studien belegen, dass es sich bei Aerobactin um einen APEC-assoziierten Virulenzfaktor handelt. 70 bis 80 % der aus Kolibazilliose isolierten *E. coli* besitzen diese Siderophore (DOZOIS et al., 1992; NGELEKA et al., 1996; JANßEN et al., 2001). Als zweites eisenaquirierendes System konnte in APEC-Isolaten Yersiniabactin nachgewiesen werden (GOPHNA et al., 2001; JANßEN et al., 2001). Diese Siderophore wurde ursprünglich bei Yersinien beschrieben.

Weiterhin besitzen einige APEC auch Hämolyse, die in der Lage sind Erythrozyten zu schädigen. Dieser seltene APEC-Phänotyp lässt sich auf Blutagarplatten nachweisen. Zwar konnte ein völlig neues Hämolyse-Gen (*hlyE*) in einem aviären pathogenen *E. coli*-Isolat identifiziert werden (REINGOLD et al., 1999), allerdings ließ es sich in zahlreichen Untersuchungen weder genotypisch in APEC-Isolaten nachweisen, noch konnte phänotypisch eine Hämolyse der entsprechenden Isolate festgestellt werden (GOMIS et al., 2000; KNÖBL et al., 2001). Demgegenüber scheint dem Temperatur-sensitiven Hämagglutinin (*tsh*) eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Kolibazilliose zuzukommen, da es einerseits zu einem hohen Anteil bei APEC-Isolaten nachgewiesen wurde, während *E. coli*-Isolate klinisch gesunder Tiere kein *tsh* besitzen (MAURER et al., 1998), und es andererseits eine enge Assoziation zur Letalität für Hühner besitzt (DOZOIS et al., 2000). Mithilfe dieses Temperatur-sensitiven Hämagglutinins scheinen APEC in die Lage versetzt zu werden, Läsionen und Fibrinablagerungen in den Luftsäcken zu induzieren. Die genaue Rolle des *tsh* in der Pathogenese der Kolibazilliose ist jedoch nicht abschließend geklärt.

Unerlässlich für eine erfolgreiche Pathogenese ist die Eigenschaft der APEC, sich bestimmten Abwehrsystemen des Wirtes zu entziehen, z. B. den bakteriziden Effekten im Serum. Diese Fähigkeit wird u. a. durch eine Kapsel, Colicin, Lipopolysaccharide (LPS), äußere Membranproteine und das sogenannte „Increased Serum Survival“-Protein (*iss*) vermittelt. Vor allem das letztgenannte *iss*-Protein weist eine starke Assoziation zu APEC-Isolaten auf (PFAFF-McDONOUGH et al., 2000). Wie die meisten der o. g. Virulenzfaktoren vermittelt es eine Resistenz gegenüber dem Komplementbindungssystem von *E. coli*-Isolaten und trägt somit entscheidend zur Virulenz bei. Doch auch hier ist der genaue Wirkungsmechanismus nicht bekannt.

Welche Rolle schließlich die wenigen von APEC-Isolaten produzierten Toxine im Krankheitsbild der Kolibazilliose spielen, ist noch weitestgehend ungeklärt. Häufig sind diese mit bestimmten Krankheitsbildern oder an bestimmte Geflügelarten assoziiert. Die Cytotoxine z. B. wurden überdurchschnittlich oft in aviären *E. coli*-Isolaten nachgewiesen, die von an dem sog. „Swollen-Head-Syndrom“ (SHS) erkrankten Tieren isoliert wurden (PARREIRA et al., 1998; SALVADORI et al., 2001). Das Shigatoxin *stx2f* hingegen wurde bislang nur bei Tauben gefunden (SCHMIDT et al., 2000). Weitere Bedeutung in der Pathogenese der Kolibazilliose kommen wahrscheinlich dem Hitze-stabilen Toxin EAST-1 sowie dem Flagellar-Toxin zu, auf dessen Grundlage ein Impfstoff entwickelt wurde.

Die genaue Identifizierung von *E. coli*-Wildtypstämmen als APEC-Isolate ist unbedingte Voraussetzung, um z. B. bestandsspezifische Impfstoffe herstellen zu können. Wie bereits erwähnt ist die Serotypisierung keine geeignete Methode, um APEC sicher nachzuweisen. Hier bieten sich genotypische Methoden an, wie z. B. die DNS-DNS-Hybridisierung oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Als Zielgene für einen spezifischen und sensitiven Nachweis eignen sich derzeit die oben genannten APEC Virulenz-assoziierten Gene am besten, denn so können nicht nur die APEC spezifisch bestimmt werden, sondern gleichzeitig kann dadurch auch das Virulenzpotenzial der Bakterien eingeschätzt werden. Das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen in Berlin hat in Zusammenarbeit mit dem Veterinär-Labor der Lohmann Tierzucht GmbH als diagnostisches Werkzeug eine Multiplex-PCR etabliert, die in Zukunft die Serotypisierung als gebräuchliches Diagnostikum ablösen soll. Mithilfe dieser erstmals beschriebenen Multiplex-PCR ist es nun möglich innerhalb weniger Stunden eine Aussage zu treffen, ob es sich um APEC oder um apathogene *E. coli* handelt. Die etablierte Multiplex-PCR weist sechs virulenzassoziierte Gene (*astA*, *irp2*, *iss*, *papC*, *iucD* und *tsh*) gleichzeitig nach. Durch den gleichzeitigen genotypischen Nachweis mehrerer Virulenz-assoziiierter Gene sowie aufgrund der simplen Verwendung bakterieller Kolonien des zu untersuchenden *E. coli*-Wildtypstammes stellt sie ein schnelles, kostengünstiges und zudem exaktes diagnostisches Werkzeug dar.

Eigene Untersuchungen

Im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen in Berlin wurden seit 1999 im Rahmen einer Doktorarbeit zahlreiche *E. coli*-Wildtypstämme serotypisiert sowie mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion genotypisiert. Sämtliche Isolate stammen aus an Kolibazilliose verendetem Geflügel und wurden vom Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH übersandt. Ziel der Arbeit war unter anderem, ein Diagnostikum zu etablieren, das möglichst schnell und sicher eine Aussage über die Pathogenität dieser Isolate geben kann.

Material und Methoden

Isolate

Es wurden insgesamt 150 *E. coli*-Isolate von an Kolibazilliose erkrankten und verendeten Hühnern unterschiedlichen Alters untersucht. Der Hauptanteil der Isolate stammte von Legehennen, des Weiteren von Broilern, Masteltern sowie Puten. Diese 150 *E. coli*-Feldstämme wurden über einen Zeitraum von 11 Jahren von verschiedenen Betrieben in Deutschland, aber auch in Ägypten,

Großbritannien und Jordanien isoliert. In der Regel stammen ein bis sechs Isolate vom gleichen Betrieb. Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte auf Gassner- sowie Blutagarplatten bei 37 °C.

DNS-DNS-Hybridisierung

Mit Hilfe der DNS-DNS-Hybridisierung lassen sich gleiche oder sehr ähnliche Sequenzen der zu untersuchenden Nukleinsäure und einer bestimmten markierten Sonde nachweisen. Die 150 zu untersuchenden aviären pathogenen *E. coli*-Isolate wurden auf die folgenden zehn virulenzassoziierten Gene untersucht: *fimC*, *papC*, *tsh*, *hlyE*, *iucD*, *fyuA*, *irp2*, *iss*, *astA* und *stx2f*. Die jeweiligen DNS-Sonden wurden mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) hergestellt. Der Hybridisierungsvorgang und die Visualisierung wurden entsprechend den Vorschriften des „DIG Luminescent Detection Kit“ (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zwecks Verifizierung wurden die *E. coli*-Feldisolate zusätzlich mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf die o. g. virulenzassoziierten Gene untersucht. Die PCR ermöglicht die exponentielle Amplifikation eines bestimmten DNS-Bereichs mittels zweier Oligonukleotid-Primer sowie der Taq-DNA-Polymerase. Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert. Als Template-DNS wurde chromosomale DNS verwendet, die mittels Hitzelyse isoliert wurde.

Multiplex-PCR

Um mehrere für die Kolibazilliose relevante virulenzassoziierte Gene nachzuweisen, wurde eine Multiplex-PCR etabliert. Diese ermöglicht es, mit nur einem PCR-Ansatz zwei und mehr DNS-Fragmente gleichzeitig zu identifizieren. Folgende Primerpaare wurden zum Nachweis der entsprechenden Gene in der Multiplex-PCR eingesetzt: EAST, ISS, HMWP-2, PAPC, AERA sowie TSH. Als Template-DNS wurden die mittels Hitzelyse aufgearbeitete chromosomale DNS sowie vergleichend eine Kolonie des zu untersuchenden Isolates direkt von der über Nacht bebrüteten LB-Agarplatte genommen.

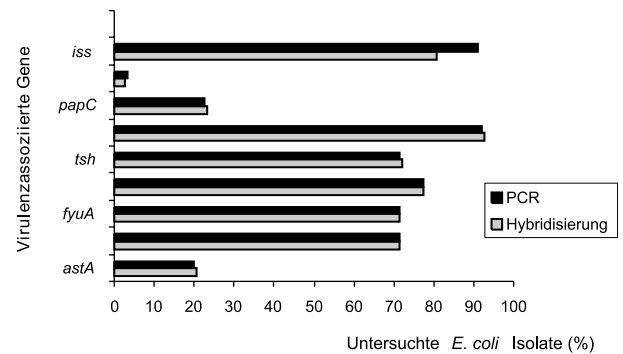
Ergebnisse

Voraussetzung für die Etablierung einer Multiplex-PCR war die vorherige Untersuchung der APEC-Wildtypstämme mittels DNS-DNS-Hybridisierung sowie Polymerase-Kettenreaktion. Ziel dieser Untersuchungen war es zunächst festzustellen, mit welcher Häufigkeit die einzelnen Virulenz-assoziierten Faktoren in der heimischen APEC-Population vorkommen. Diese Daten sollten dann weiterhin dazu genutzt werden, diejenigen Gene zu identifizieren, die als Zielgene für eine Multiplex-PCR geeignet sind.

Die o. g. virulenzassoziierten Gene konnten durch diese Untersuchungsmethoden relativ übereinstimmend nachgewiesen werden. Lediglich die Fimbriengene *fimC* und *papC* sowie das für das Temperatur-sensitive Hämagglutinin kodierende *tsh* und das Toxingen *astA* wurden durch die DNS-DNS-Hybridisierung jeweils in einem Isolat häufiger nachgewiesen, als mittels der PCR. Bezüglich des Nachweises des Aerobactin-kodierenden *iucD* kam es bei zwei Isolaten mit den jeweiligen Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die für die Eisenaquirie-

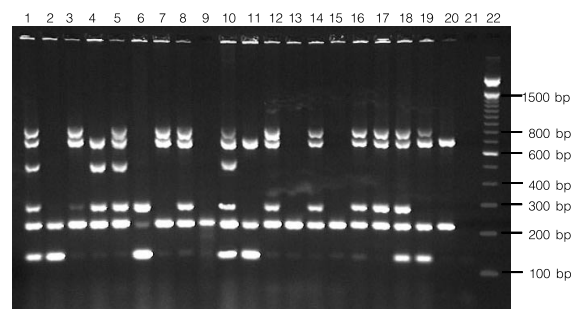
rung essenziellen Yersiniabactin-Gene *fyuA* und *irp2* wurden in jeweils übereinstimmender Anzahl in den 150 untersuchten *E. coli*-Feldisolaten gefunden. Auf das Vorhandensein des *iss*-Genes, welches das entsprechende für die Serumresistenz wichtige Increased Serum Survival Protein kodiert, des Hämolyisins *hlyE* sowie des Toxingens *stx2f* wurden nur stichprobenartig 22 (*iss*), 64 (*hlyE*) und 87 (*stx2f*) *E. coli*-Isolate mittels PCR untersucht, die Ergebnisse dieser untersuchten Isolate stimmen mit denen der DNS-DNS-Hybridisierung absolut überein. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Verteilung der Virulenz-assoziierten Gene.

Abbildung 1: Nachweis virulenzassoziiierter Gene mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Mithilfe der Multiplex-PCR werden die Isolate auf sechs virulenzassoziierte Gene gleichzeitig getestet. Es handelt sich hierbei um das Toxingen *astA*, die für Eisenaquirierung wichtigen Gene *irp2* und *iucD*, das *iss*, welches eine Rolle in der Anti-Wirtsabwehr spielt, das Fimbriengen *papC* sowie *tsh*, welches das entsprechende Protein kodiert. Als Template-DNS wurden anfangs sowohl jeweils 2µl Hitzelyse als auch jeweils eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes eingesetzt. Die Ergebnisse der Multiplex-PCR, die mittels Kolonien erzielt wurden, waren mit denen der Hitzelyse identisch, so dass schließlich zwecks Vereinfachung des Diagnostikums nur noch Kolonien als Template-DNS eingesetzt wurden. Abbildung 2 zeigt exemplarisch ein Elektropherogramm einer Multiplex-PCR, in der 19 *E. coli* Feldisolate auf das Vorkommen der sechs genannten virulenzassoziierten Gene untersucht wurden.

Abbildung 2: Elektropherogramm einer Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (1,5%-iges Agarose-Gel, 2,5 h, 90 V)



1: Positivkontrolle IMT 2540, 2: IMT 4537, 3: IMT 4539, 4: IMT 4 641, 5: IMT 5124, 6: IMT 2111, 7: IMT 2488, 8: IMT 4532, 9: IMT 5127, 10: IMT 5215, 11: IMT 5125, 12: IMT 2297, 13: IMT 2275, 14: IMT 2293, 15: IMT 2282, 16: IMT 2283, 17: IMT 2271, 18: IMT 2272, 19: IMT 2264, 20: IMT 2265, 21: Leerwert, 22: Marker 100 bp-ladder
Die einzelnen PCR-Amplifikate besitzen folgende Fragmentgrößen: *astA* 120bp, *iss* 219bp, *irp2* 287bp, *papC* 519bp, *iucD* 711 und *tsh* 823bp.

Diskussion

Die Kolibazilliose ist eine weltweit vorkommende und mit großen wirtschaftlichen Verlusten verbundene Erkrankung des Geflügels. Sie tritt sowohl als Sekundärinfektion (v. a. nach Erkrankungen des Respirationstraktes) als auch als Primärinfektion in Betrieben mit klinisch unauffälligen Herden auf. Bislang wurden zwar zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt, um nähere Einblicke in die Pathogenese der Kolibazilliose zu erhalten, die genauen Mechanismen, mit denen die Virulenzfaktoren der aviären pathogenen *E. coli* in der Lage sind Infektionen zu verursachen, sind jedoch noch nicht exakt bekannt. Auch liegen bislang kaum epidemiologische Arbeiten vor, um z. B. nähere Aufschlüsse über die Verbreitung und Einschleppung in die jeweiligen Betriebe zu bekommen (TABLANTE et al., 1999; JANßEN et al., 2001). Aus diesem Grund wurden in unserem Institut zahlreiche *E. coli*-Wildtypstämme mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion genotypisiert. Damit sollten zum einen nähere Aufschlüsse über das Vorkommen und die Verteilung der virulenzassoziierten Gene in APEC erbracht werden. Zusätzlich waren diese Untersuchungen Voraussetzung für die Etablierung einer diagnostischen Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR).

Literaturangaben sowie Auskünfte diagnostisch tätiger Institutionen belegen, dass die Differenzierung zwischen aviären pathogenen (APEC) und apathogenen *E. coli*-Isolaten ein außerordentlich großes Problem darstellt. Die unbefriedigende Serotypisierung ist nach wie vor das gebräuchlichste Diagnostikum zur Identifizierung von APEC-Isolaten. Vor allem die Serovaren O1:K1, O2:K1 und O78:K80 werden häufig aus den Erregern der Kolibazilliose isoliert, allerdings lassen sich nur rund die Hälfte der Isolate mit diesen drei Antisera nachweisen (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999). Aus diesem Grund wurde als diagnostisches Werkzeug eine Multiplex-PCR etabliert, welche in Zukunft die Serotypisierung als gebräuchliches Diagnostikum ablösen wird. Durch die Multiplex-PCR können gleichzeitig sechs virulenzassoziierte Gene nachgewiesen werden (*astA*, *irp2*, *iss*, *papC*, *iucD* und *tsh*). Aufgrund der fehlenden Aufarbeitung der genomischen DNS stellt diese Multiplex-PCR ein schnelles, kostengünstiges sowie exaktes Diagnostikum dar.

Basis für die Etablierung einer Multiplex-PCR und deren routinemäßige Anwendung waren das mittels DNS-DNS-Hybridisierung und PCR ermittelte Vorkommen und die Verteilung der virulenzassoziierten Gene in aviären pathogenen *E. coli*-Feldisolaten sowie die Überprüfung der Validität der PCR. Durch diese beiden Methoden konnten die Gene nahezu übereinstimmend in den Isolaten festgestellt werden, so dass die Multiplex-PCR als Diagnostikum empfohlen werden kann. Zusätzlich ließen sich die eisenaquirierenden Gene *irp2* und *fyuA* immer in Kombination nachweisen, folglich lässt sich durch die Multiplex-PCR auch eine Aussage über das Vorkommen von *fyuA* treffen. Die virulenzassoziierten Gene *stx2f* und *hlyE* wurden in der vorliegenden Arbeit nicht bzw. nur in wenigen Isolaten nachgewiesen und scheinen somit in der Pathogenese der Kolibazilliose keine entscheidende Rolle zu spielen.

Durch die Multiplex-PCR, die in Zusammenarbeit mit dem Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH etabliert wurde, kann nunmehr eine sichere Diagnostik durchgeführt werden. Es ist damit möglich, aviäre pathogene *E. coli*-Isolate im Krankheitsfalle nachzuweisen und entsprechend eindeutig von den apathogenen *E. coli* zu differenzieren.

Des Weiteren können durch dieses Verfahren aufgrund der Verteilung der virulenzassoziierten Gene Impfstämme ausgewählt werden, die sich als besonders pathogen für Geflügelbestände herausgestellt haben. Schließlich ist es möglich, mithilfe der Multiplex-PCR Infektionsquellen auffindig zu machen, so dass die Verschleppung aviärer pathogener *E. coli*-Isolate in verschiedene Betriebe und daraus resultierend eine rasche Verbreitung der Kolibazilliose verhindert werden kann.

Zusammenfassung

Bislang ist die Serotypisierung das gebräuchlichste diagnostische Werkzeug zur Identifizierung von aviären pathogenen *E. coli*-Isolaten. Diese Methode hat jedoch zwei schwerwiegende Nachteile. Sie ist zum einen unsicher, denn eine Vielzahl von APEC-Wildtypstämmen gehören nicht den gängigen Serovaren O1:K1, O2:K1 oder O78:K80 an. Zum anderen gibt selbst ein positiver Serotypisierungsbefund keine Aussage über das Virulenzpotenzial des jeweiligen Isolates. Aus diesem Grund wurde auf Basis der genotypischen Untersuchung zahlreicher APEC-Stämme mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine Multiplex-PCR etabliert, die dazu dient, *E. coli*-Wildtypstämme innerhalb kürzester Zeit und mit geringem finanziellem Aufwand zu charakterisieren und als aviär pathogen zu identifizieren. Mittels der Multiplex-PCR ist es ebenfalls möglich, besonders pathogene *E. coli*-Isolate in einem Bestand zu identifizieren. Diese Isolate können als Grundlage für die Herstellung eines Impfstoffes herangezogen werden, welcher effektiv gegen APEC-Infektionen eingesetzt werden kann. Auch können aufgrund der Infektkettenforschung neue und effektive Kontrollen durchgeführt werden, um eine rasche Verbreitung der aviären pathogenen *E. coli* zu verhindern. Schließlich kann das Wissen um das Vorkommen und die Verteilung der virulenzassoziierten Gene für weitere epidemiologische Studien genutzt werden, um neue Einblicke in die Pathogenese der Kolibazilliose des Geflügels zu erhalten.

Literatur

- BARNES, H.J., W.B. GROSS (1999): Colibacillosis. In: Diseases of poultry. Gross, W. B. (ed.). Ames Iowa, Iowa State University Press:131-141
- CHIPPERFIELD, J.R., C. RATLEDGE (2000): Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* 13(2):165-8
- DHO-MOULIN, M., J.M. FAIRBROTHER (1999): Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 30(2-3):299-316
- DOZOIS, C.M., FAIRBROTHER, J.M., HAREL, J., M. BOSSE (1992): *papA* and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* 60(7):2648-56
- DOZOIS, C.M., CHANTELOUP, N., DHO-MOULIN, M., BREE, A., DESAUTELS, C., J.M. FAIRBROTHER (1994): Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* 38(2):231-9
- DOZOIS, C.M., DHO-MOULIN, M., BREE, A., FAIRBROTHER, J.M., DESAUTELS, C., 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(7):4145-54
- GOMIS, S.M., GOMIS, A.I., HORADAGODA, N.U., WIJEWARDENE, T.G., ALLAN, B.J., A.A. POTTER (2000): Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Trop Anim Health Prod* 32(6):341-51
- GOPHNA, U., OELSCHLAEGER, T.A., HACKER, J., E.Z. RON (2001): Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol Lett* 196(1):57-60
- JANßEN, T., SCHWARZ, CH., PREIKSCHAT, P., VOB, M., PHILIPP, H.-C., L.H. WIELER (2001): Virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:371-378

- JOHNSON, J.R., STELL, A.L., SCHEUTZ, F., O'BRYAN, T.T., RUSSO, T.A., CARLINO, U.B., FASCHING, C., KAVLE, J., VAN DIJK, L., W. GAASTRA (2000): Analysis of the F antigen-specific papA alleles of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay. *Infect Immun* 68(3):1587-99
- KNÖBL, T., BACCARO, M.R., MORENO, A.M., GOMES, T.A., VIEIRA, M.A., FERREIRA, C.S., A.J. FERREIRA (2001): Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. *Vet Microbiol* 83(1):71-80
- MAURER, J.J., BROWN, T.P., STEFFENS, W.L., S.G. THAYER (1998): The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 42(1):106-18
- NGELEKA, M., KWAGA, J.K., WHITE, D.G., WHITTAM, T.S., RIDDELL, C., GOODHOPE, R., POTTER, A.A., B. ALLAN (1996): *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immun* 64(8):3118-26
- OLSEN, A., WICK, M.J., MORGELIN, M., L. BJORCK (1998): Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun* 66(3):944-9
- ORNDORFF, P.E. (1994): *Escherichia coli* type 1 pili. In: Molecular genetics of bacterial pathogenesis. Miller, V. L., Kaper, J. B., Portnoy, D. A., R. R. Isberg, (ed.). Washington, DC, ASM Press: 91-111
- PARREIRA, V.R., T. YANO (1998): Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). *Vet Microbiol* 62(2):111-9
- PFAFF-McDONOUGH, S.J., HORNE, S.M., GIDDINGS, C.W., EBERT, J.O., DOETKOTT, C., SMITH, M.H., L.K. NOLAN (2000): Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis* 44(1):23-33
- PHILIPP, H.C., M. VOß (2001): Was wissen wir über Coli-Infektionen bei Legehennen? *Lohmann Information* 2/2001:41-44
- POURBAKHSH, S.A., BOULIANNE, M., MARTINEAU-DOIZE, B., DOZOIS, C.M., DESAUTELS, C., J.M. FAIRBROTHER (1997): Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis* 41(1):221-33
- POURBAKHSH, S.A., BOULIANNE, M., MARTINEAU-DOIZE, B., J.M. FAIRBROTHER (1997a): Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* 58(2-4):195-213
- REINGOLD, J., STARR, N., MAURER, J., M.D. LEE (1999): Identification of a new *Escherichia coli* She aemolysin homolog in avian *E. coli*. *Vet Microbiol* 66(2):125-34
- SALVADORI, M.R., YANO, T., CARVALLHO H.E., PARREIRA, V.R., C.L. GYLES (2001): Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* 45(1):43-51
- SCHMIDT, H., SCHEEF, J., MORABITO, S., CAPRIOLI, A., WIELER, L.H., H. KARCH (2000): A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* 66(3):1205-8
- VAN DEN BOSCH, J.F., HENDRIKS, J.H., GLADIGAU, I., WILLEMS, H.M., STORM, P.K., F.K. DE GRAAF (1993): Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 61(3):800-6
- VIDOTTO, M.C., NAVARRO, H.R., L.C. GAZIRI (1997): Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 59(1):79-87
- WOOLEY, R.E., SPEARS, K.R., BROWN, J., NOLAN, L.K., O.J. FLETCHER (1992): Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 36(3):679-84