

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur Prävalenz und
pathogenen Bedeutung enterohämorrhagischer,
enteroaggregativer und enteroinvasiver
Escherichia coli beim Hund**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Bianca Thamm
aus Dinkelsbühl

Hannover, 2000

Wissenschaftliche Betreuung: Apl. - Prof. Dr. G. Amtsberg

1. Gutachter: Apl. - Prof. Dr. G. Amtsberg

2. Gutachter: Univ. – Prof. Dr. I. Nolte

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.00

für Arno

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Durchfallerreger beim Hund -----	3
2.1.1 Enteroparasiten -----	3
2.1.1.1 Helminthen -----	3
2.1.1.2 Protozoen -----	8
2.1.2 Bakterielle Durchfallerreger -----	12
2.1.2.1 Yersinien -----	12
2.1.2.2 Salmonellen -----	14
2.2 Darmpathogene <i>Escherichia coli</i> -----	19
2.2.1 Darmpathogene <i>Escherichia coli</i> bei Hunden -----	21
2.2.2 Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (EIEC) -----	25
2.2.2.1 Pathogenitätsfaktoren -----	25
2.2.2.2 Diagnostik -----	25
2.2.2.3 Epidemiologie -----	26
2.2.3 Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> (EAEC) -----	27
2.2.3.1 Pathogenitätsfaktoren -----	27
2.2.3.2 Diagnostik -----	29
2.2.3.3 Epidemiologie -----	29
2.2.4 Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> (EHEC) -----	30
2.2.4.1 Pathogenitätsfaktoren -----	31
2.2.4.2 Diagnostik -----	35
2.2.4.3 Epidemiologie -----	36

Inhaltsverzeichnis

3	Material und Methoden	40
3.1	Probenmaterial und Versuchsaufbau-----	40
3.2	Parasitologische Untersuchung-----	44
3.3	Mikrobiologische Untersuchung -----	45
3.4	DNA-Analyse mittels PCR-----	46
3.4.1	Gewinnung und Reinigung bakterieller DNA-----	47
3.4.2	PCR-Ansatz -----	48
3.4.3	PCR-Bedingungen, Nukleotidsequenzen der Primer, Kontroll- stämme -----	50
3.4.4	Gelelektrophorese -----	51
3.5	Shigatoxin - Test -----	53
3.5.1	Anreicherung in modifizierte tryptische Sojabouillon (m-TSB): -----	53
3.5.2	EIA-----	54
3.6	Kolonienblot-Hybridisierung -----	55
3.6.1	PCR zur DNA-Sondenmarkierung mit Digoxigenin-11-dUTP -----	55
3.6.2	Hybridisierungsreaktion: -----	57
4	Ergebnisse	61
4.1	Ergebnisse der parasitologischen Untersuchung-----	61
4.2	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung -----	62
4.3	Nachweishäufigkeit ausgewählter <i>E. coli</i> - Virulenzgene -----	66
4.3.1	Nachweis von Shigatoxinen -----	70
4.4	Korrelation zwischen <i>E. coli</i> - Virulenzgenen und Durchfallsymptomen-	70
4.5	Nachweishäufigkeit von <i>E. coli</i> - Virulenzgenen bei antibiotischer/ chemotherapeutischer Prämedikation -----	72
4.6	Nachweishäufigkeit von <i>E. coli</i> - Virulenzgenen in Abhängigkeit von der Fütterung -----	73
4.7	Erregerisolierung und Serotypisierung-----	75

4.8 Anamnesedaten und Untersuchungsergebnisse von Hunden bei denen <i>stx-</i> <i>hly-</i> oder <i>eagg-</i> Gene nachgewiesen worden waren -----	78
4.9 Statistische Auswertung -----	79
5 Besprechung der Ergebnisse	83
6 Zusammenfassung.....	97
7 Summary.....	99
8 Literaturverzeichnis	101

Verzeichnis der Abkürzungen

A/E- Läsionen	Attaching and effacing - Läsionen
AMP	Adenosinmonophosphat
BFP	Bundle forming pilus
CFA	Colonization factor antigen
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleinacid
DNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
DUTP	Deoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia (E.) coli</i>
<i>Eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing - Gen
EAEC	Enteroggregative <i>E. coli</i>
EAF	EPEC adherence factor
<i>Eagg</i>	Virulenzgen der EAEC
EAST-1	Enteroggregatives hitzesatabiles Toxin - 1
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
E-Hly	EHEC- Hämolysin oder Enterohämolysin
EIA	Enzyme immunoassay
EIEC	Einteroinvasive <i>E. coli</i>
EIET	Enteroinvasives Enterotoxin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
Esp	<i>E. coli</i> secreted proteins
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
F	Fimbrien-Antigen
GMP	Guanosinmonophosphat
HC	Hämorrhagische Colitis

HPLC	High pressure liquid chromatography
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
Ig	Immunglobulin
Ipa	Invasion plasmid antigen
K	Kapselantigen
Kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheit
LEE	Locus of enterocyte effacement
LT	Hitzelabiles Toxin
m- TSB	modifizierte tryptische Sojabouillon
Nt	nicht typisierbar
OD	Optische Dichte
P	Pilusantigen
Pas	Protein associated with secretion
PCR	Polymerase chain reaction
<i>PCVD</i> ⁴³²	Virulenzplasmid der EAEC
<i>PINV</i>	Invasionsplasmid
RNA	Ribonucleinacid
<i>S. spp.</i>	<i>Salmonella (S.) spp.</i>
Sen	Shigellenenterotoxin – Gen
ShET	Shigellenenterotoxin
SMAC-Agar	Sorbitol-MacConkey – Agar
ST	Hitzestabiles Toxin
Stx	Shigatoxin
<i>Stx</i>	Shigatoxin- Gen
Tir	Translocated intimin receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
<i>Y. spp.</i>	<i>Yersinia (Y.) spp.</i>

1 Einleitung

E. coli - Bakterien erfüllen als Teil der physiologischen Darmflora bei den meisten homoiothermen Tierarten wichtige Regulationsfunktionen. Darüber hinaus sind pathogene Wirkungstypen bekannt, die bei Mensch und Tier als Krankheitserreger vorkommen. Zu den humanpathogenen Erregern gehören die enterohämorrhagischen (EHEC), die enteroaggregativen (EAEC) und die enteroinvasiven (EIEC) *E. coli*.

EHEC sind seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. In Deutschland zählen sie neben Salmonellen und *Campylobacter* zu den häufigsten bakteriellen Durchfallerregern beim Menschen. Außerdem verursachen sie schwere postenteritische Komplikationen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), das vor allem bei Kindern unter 5 Jahren zu Todesfällen führen kann (BOCKEMÜHL u. KARCH, 1996). Als Erregerreservoir wurden Wiederkäuer insbesondere landwirtschaftlich genutzte Rinder identifiziert. Bei anderen Tierarten konnten EHEC ebenfalls nachgewiesen werden, hier kommen sie jedoch weitaus seltener vor.

EIEC und EAEC wurden bisher ausschließlich beim Menschen nachgewiesen. Durch EIEC - Bakterien hervorgerufene Durchfälle zeigen einen der Shigellenruhr vergleichbaren Verlauf mit teilweise blutigem, febrilen Charakter (DU PONT et al., 1991). Im Gegensatz dazu verursachen EAEC eher milde chronische Durchfälle. Außerdem werden sie mit kindlichen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht (LAW u. CHART 1998).

Welche Rolle Hunde in der Epidemiologie der EHEC-, EIEC- und EAEC- Infektionen spielen und ob Hunde in ähnlicher Weise wie der Mensch an einer Infektion mit diesen Erregern erkranken können ist ungeklärt (BEUTIN, 1999). Da Hunde in enger Hausgemeinschaft mit dem Menschen leben, sind Kenntnisse über das Vorkommen dieser pathogenen *E. coli*- Bakterien bei Hunden für den Tierarzt sowohl in therapeutischer Hinsicht, wie auch in seiner Verantwortung gegenüber dem Tierbesitzer von großem Interesse.

Einleitung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Erreger bei Hunden vorkommen, ob sie beim Hund Durchfall auslösen können und ob Hunde eine mögliche Infektionsquelle für den Menschen darstellen. Dazu sollten Kotproben von klinisch gesunden und durchfallkranken Hunden auf verschiedene Virulenzgene der EHEC, EAEC und EIEC untersucht und die Untersuchungsergebnisse zu den Befunden aus der parasitologischen und mikrobiologischen Untersuchung sowie zu verschiedenen Anamnesedaten in Beziehung gesetzt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Durchfallerreger beim Hund

Durchfall ist das für den Tierhalter auffälligste klinische Symptom einer gastrointestinalen Erkrankung seines Hundes und einer der häufigsten Gründe aus denen Hunde in der Tierarztpraxis vorgestellt werden (BURROWS, 1983). Als Durchfall bezeichnet wird abnorm häufiger, abnorm weicher und in der Menge vermehrter Kotabsatz (PHILLIPS, 1972).

Ätiologisch kommen eine Vielzahl möglicher Ursachen in Betracht. Neben diätetischen Mängeln, psychischen Faktoren oder systemischen Erkrankungen können Infektionen des Magen-Darm-Kanals Durchfall auslösen. Im Folgenden sollen wichtige parasitäre und bakterielle Durchfallerreger des Hundes beschrieben werden.

2.1.1 Enteroparasiten

Das Krankheitsbild enteraler Parasitosen reicht von unspezifischen milden Diarrhöen bis hin zu schweren hämorrhagischen Enteritiden vorwiegend bei Welpen oder geschwächten Hunden. Der überwiegende Teil der Infektionen verläuft jedoch ohne klinische Symptome (SHERDING u. BURROWS, 1992).

2.1.1.1 Helminthen

Die enteroparasitischen Helminthen des Hundes werden in Nematoden (Rundwürmer) und Cestoden (Bandwürmer) unterteilt.

Literaturübersicht

Weltweit am häufigsten beim Hund nachzuweisen ist die zu den Nematoden gehörende Askaridenart *Toxocara canis* (SHERDING u. BURROWS, 1992). Am Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover gelang der Nachweis dieser Parasiten im Zeitraum von 1984-91 in 6,9% der untersuchten Hundekotproben (EPE et al., 1993, siehe Tabelle 2.1.2).

Die Toxokarose ist gekennzeichnet durch Husten, Erbrechen, schleimigen Durchfall, akutes Abdomen, Darmverschuß und allgemeiner Kräfteverfall. Betroffen sind in erster Linie Welpen, die sich bereits intrauterin oder galaktogen durch hormonell reaktivierte Larven aus der Muskulatur der Mutterhündin infizieren. Beim Welpen absolvieren die Parasiten ausgehend vom Darm eine Leber-Lungen-Wanderung, während der sie mehrere Larvenstadien durchlaufen, bevor sie über Trachea und Oesophagus erneut in den Darm gelangen um dort ihre Entwicklung zu Adultes zu vollenden (OVERGAAUW, 1997).

Die Infektion adulter Hunde erfolgt durch orale Aufnahme von infizierten Mäusen oder mit dem Kot ausgeschiedenen Oocysten. Beim erwachsenen Hund findet aufgrund einer meistens bestehenden Immunität nur eine unvollständige Körperwanderung statt. Sie endet in der Muskulatur, wo die Larven in Granulome eingeschlossen werden und über Jahre hinweg symptomlos persistieren können. (OVERGAAUW u. BOERSEMA, 1998).

Den hohen latenten Durchseuchungsgrad der Population und die besondere Bedeutung der Toxokarose beim Welpen verdeutlicht eine Untersuchung an 100 Hundefamilien aus Süddeutschland. Die Untersuchung ergab eine Oocystenausscheidung bei 67% der Würfe und 45% der Mutterhündinnen (GOTHE u. REICHLER, 1990; siehe Tabelle 2.1.2).

In fakultativen Zwischenwirten wie z.B. Mäusen, aber auch beim Menschen machen die Larven als *Larvae migrantes viscerales* eine nur unvollständige Körperwanderung durch und verursachen verschiedene teilweise schwerwiegende organische Defekte. Beim Menschen sind vor allem zentralnervöse Störungen und Sehschäden beschrieben (MAGNAVAL et al., 1997; DIETRICH et al., 1998).

Toxascaris leonina, die zweite beim Hund vorkommende Askaridenart hat geringere Bedeutung. Bei dieser Art erfolgt die Larvenentwicklung ausschließlich in der Darmwand.

Ebenfalls zu den Nematoden gehören die Ankylostomen (Hakenwürmer), die beim Hund mit zwei Arten vertreten sind, *Ancylostoma caninum* und *Uncinaria stenocephala*. Ankylostomen absolvieren wie *Toxocara canis* eine Körperwanderung, jedoch nur nach perkutaner Infektion. Die infektiöse Larve bohrt sich aktiv durch die Haut des Wirts und gelangt über eine Herz - Lungen - Oesophaguspassage in den Darm um dort die Entwicklung zum Adultus abzuschließen. Nach galaktogener oder oraler Infektion unterbleibt die Körperwanderung in der Regel. Adulte Würmer besiedeln vorwiegend das Jejunum, wo sie die Darmwand andauen und Blut saugen.

Infizierte Hunde sind anämisch und zeigen allgemeinen Kräfteverfall. Meist wird blutig breiiger Kot abgesetzt. Bei Jungtieren kann die Erkrankung tödlich verlaufen (SCHNIEDER, 1996; EPE, 1999).

Beim Menschen wandern die Larven nach perkutaner Infektion als *Larvae migrantes cutaneae* im Unterhautbindegewebe umher, wo sie extremen Pruritus verursachen (STINGL, 1982). Enterale Infektionen mit *Ancylostoma caninum* sind beim Menschen ebenfalls beschrieben (PROCIV u. CROESE, 1996; HENDRIX, 1996).

Die Nematodenfamilie der Trichuriden (Peitschenwürmer) ist beim Hund nur mit der Art *Trichuris vulpis* vertreten. Die Larvenentwicklung dieses Parasiten findet im Darm statt. Adulte Würmer verankern sich in der Schleimhaut von Colon und Caecum und saugen Blut. Starker Befall kann blutige Durchfälle verursachen und zu Anämie und Abmagerung führen (SHERDING u. BURROWS, 1992; BAUER et al., 1999).

Die Diagnose der Nematodeninfektionen erfolgt durch Anreicherungsverfahren anhand der charakteristischen mit den Faeces ausgeschiedenen Oocysten. *Toxocara canis* kann auch anhand erbrochener adulter Würmer diagnostiziert werden (MEHLHORN, 1993).

Cestodeninfektionen verlaufen häufig asymptomatisch. Da Cestoden dem Chymus erhebliche Mengen an Nährstoffen entziehen können, kommt es bei starkem Befall zu Gewichtsverlust und allgemeinem Kräfteverfall. Die hervorgerufenen Durchfall-

symptome sind eher unspezifisch. Hämorrhagische Enteritiden oder Ileus werden nur sehr selten beobachtet (SHERDING u. BURROWS, 1992).

Bandwürmer folgen einem obligat mehrwirtigen Entwicklungszyklus. Der Endwirt Hund scheidet terminale Bandwurmproglottiden aus, die für Zwischenwirte infektiöse Oozysten enthalten. Nach oraler Infektion entwickeln sich in den Organen oder Geweben des Zwischenwirts sog. Finnen. (siehe Tabelle 2.1.1). Hunde infizieren sich durch orale Aufnahme finnenhaltiger Organe oder Gewebe von Zwischenwirten (MEHLHORN, 1993), so daß Cestoden- im Gegensatz zu Nematodeninfektionen als Durchfallursache beim Welpen noch keine Bedeutung haben. In Tabelle 2.1.1 sind die wichtigsten Bandwurmartarten des Hundes aufgelistet.

Der in Europa bei Hunden am häufigsten nachgewiesene Bandwurm ist *Dipylidium caninum*. Auffällig wird die Infektion meist durch einen ausgeprägten Juckreiz in der Analgegend, der durch auswandernde Proglottiden verursacht wird (SHERDING U. BURROWS, 1992). Zwischenwirte sind Flöhe und Haarlinge, die vom Hund bei der Fellpflege oral aufgenommen werden. Beim Zerbeißen der Zwischenwirte können Bandwurm-Zystizerkoide in der Mundhöhle des Hundes freigesetzt und mit dem Speichel durch Belecken auf den Menschen übertragen werden. Beim Menschen bildet *Dipylidium caninum* im Gegensatz zu anderen Bandwurmartarten keine Gewebeszysten sondern siedelt sich im Darm an. (NEAFIE u. MARTY, 1993; BRANDSTETTER u. AUER, 1994).

Zu den wichtigsten Taenienarten des Hundes gehören *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis*, *Taenia hydatigena*, *Taenia multiceps*, *Taenia serialis* und *Taenia crassiceps*. Bei Hunden verläuft die Infektion meist subklinisch. Befallene Zwischenwirte zeigen je nach Lokalisation der Finnen teilweise erhebliche gesundheitliche Störungen (siehe Tabelle 2.1.1; DEPLAZES u. ECKERT, 1988; EPE et al., 1993). Beim Menschen können *Taenia multiceps* und *Taenia serialis* zerebrale Coenurose bzw. Coenurose im Bindegewebe verursachen (PAU et al., 1990; BENDER et al., 1981).

Die *Echinococcus* - Arten sind als Zoonoseerreger von besonderer Bedeutung. Beim Hund kommen zwei Arten vor, der dreigliedrige Hundebandwurm *Echinococcus granulosus* und der fünfgliedrige Bandwurm oder Fuchsbandwurm *Echinococcus multi-*

lokularis. Die Finnen von *Echinococcus multilocularis*, sog. multilokuläre Zysten, wachsen infiltrativ und metastasieren häufig. Die Infektion ist für betroffene Zwischenwirte und für den Menschen immer als lebensbedrohlich anzusehen. Die Finnen von *Echinococcus granulosus*, sog. Hydatiden wachsen meist langsam und expansiv, so daß bei dieser Art bessere Heilungsaussichten bestehen. (ECKERT, 1997; TARATUTO u. VENTURIELLO, 1997).

Die Diagnose der einzelnen Bandwurmartarten erfolgt anhand terminaler Proglottiden, die mit dem Kot ausgeschieden werden. Durch Anreicherungsverfahren können außerdem Oocysten nachgewiesen werden, wobei nur bei *Dipylidium caninum* anhand seiner typischen Eipakete eine Artdiagnose möglich ist. *Taenia*- und *Echinococcus*-Oocysten weisen keine morphologischen Unterschiede auf (MEHLHORN et al., 1993).

Tabelle 2.1.1: Übersicht über die wichtigsten Bandwurm - Arten des Hundes

Bandwurmart	Zwischenwirte	Finnen im Zwischenwirt	Mensch
<i>Dipylidium caninum</i>	Flöhe, Haarlinge	Zystizerkoid	Dipylidiasis
<i>Taenia pisiformis</i>	Nager, Hasenartige	Zystizerkus	
<i>Taenia ovis</i>	Schafe, Ziegen	Zystizerkus in der Muskulatur	
<i>Taenia hydatigena</i>	Pflanzenfresser	Zystizerkus in Gekröse und Leber	
<i>Taenia multiceps</i>	Schafe	Coenurus cerebralis im Gehirn	zerebrale Coenurose
<i>Taenia serialis</i>	Nager	Coenurus im intermuskulären Bindegewebe	Coenurose im Bindegewebe
<i>Taenia crassiceps</i>	Mäuse	Zystizerkus	
<i>Echinococcus granulosus</i>	Schweine, Wiederkäuer, Pferde	Hydatiden in Leber und anderen Organen (expansives Wachstum)	zystische Echinokokkose
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Nager	multilokuläre Zysten in Leber und anderen Organen (infiltratives, metastasierendes Wachstum)	alveoläre Echinokokkose

2.1.1.2 Protozoen

Unter den Protozoen sind vor allem die Giardien und die Kokzidien für den Hund von Bedeutung (siehe Tab. 2.1.2).

Die wichtigste beim Hund vorkommende Giardienart ist *Giardia canis*. Da Giardien teilweise nicht wirtsspezifisch sind und zwischen den einzelnen Arten nur geringe Merkmalsunterschiede bestehen, wird nach wie vor diskutiert, die bei Haussäugetie-

ren und Menschen vorkommenden Arten zu einer Art zusammen zu fassen (KIRKPATRICK, 1987).

Giardieninfektionen verlaufen häufig subklinisch. Bei Jungtieren und geschwächten Hunden treten neben akuten Durchfällen vor allem chronisch intermittierende, schleimige, gelegentlich auch blutige Durchfälle auf. Eine Infektion kann unbehandelt monatelang persistieren (SHERDING u. BURROWS, 1992; KIRKPATRICK, 1987). Giardien besiedeln vorwiegend das Duodenum und Jejunum, wo sich die vegetativen Stadien, sog. Trophozoiten, an die Darmzotten heften und den Mikrovillirasen der Enterozyten beschädigen. Als infektiöse Form werden Zysten mit dem Kot ausgeschieden, die über Wochen in der Umwelt überleben können (MEHLHORN et al., 1993).

Die Giardiasis gilt als Zoonose. *Giardia lamblia*, der Erreger der Giardiasis des Menschen konnte experimentell auf Hunde übertragen werden (SHAW et al., 1977; HEWLETT et al., 1982). Vergleichende Untersuchungen von Giardiaisolaten aus Aborigenes und ihren Hunden in Australien ergaben jedoch genetische Unterschiede zwischen humanen und caninen Stämmen, so daß der Erregeraustausch zwischen Hund und Mensch unter natürlichen Bedingungen nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben scheint (HOPKINS et al., 1997).

Die Diagnose erfolgt durch Nachweis der ausgeschiedenen Zysten mittels Anreicherung oder durch Nachweis der Trophozoiten im Direktausstrich. Ein Antigennachweis in den Faeces ist ebenfalls möglich (KIRKPATRICK, 1987; HAHN et al., 1988).

Für den Hund relevante Kokzidien sind die *Isospora*- und *Cryptosporidium*-Arten. Außerdem können *Hammondia heydorni* und verschiedene *Sarcocystis*-Arten nachgewiesen werden. Diese gelten aber als für den Hund nicht pathogen (SHERDING U. BURROWS, 1992).

Zu den caninen *Isospora* - Arten gehören (*Cysto*)*isospora canis*, (*Cysto*)*isospora ohioensis* und *Isospora burrowsi*. In unspezifischen Wirten wie z. B. Mäusen bilden *Isospora* - Arten Dauerstadien, sog. Dormozoen, die für den Hund infektiös sind. Nach oraler Aufnahme von Dormozoen oder sporulierten Oozysten findet intrazellulär in den Darmepithelzellen eine Schizogonie und anschließend die Gamogonie

statt. Ausgeschieden werden unsporulierte Oozysten, die dann in der Umwelt reifen. Die Infektion verläuft meist symptomlos. Bei massivem Befall kommt es zu wässrig-blutigem Durchfall. Wenn erhebliche Teile der Darmschleimhaut zerstört werden, kann die Infektion letal verlaufen (MEHLHORN, 1993).

Von den Cryptosporidien kommt *Cryptosporidium parvum* als einzige Art beim Hund vor. Im Gegensatz zu den *Isospora*-Arten vermehren sich Cryptosporidien extrazellulär. Die gebildeten Oozysten können bereits im Darm sporulieren und ihre Sporozoen freisetzen, was zu einem Massenbefall des infizierten Hundes führen kann (MEHLHORN, 1993).

Die Kryptosporidiose verläuft meist asymptomatisch. Klinisch manifest wird die Infektion in erster Linie bei Jungtieren (WILSON et al., 1983). Symptome sind wässrig-schleimiger Durchfall, Maldigestion, Malabsorption durch Atrophie der Mikrovilli, Dehydratation und gelegentlich Fieber. Oft ist die Kryptosporidiose mit anderen Infektionen vergesellschaftet (FUKUSHIMA u. HELMAN, 1984).

Cryptosporidium parvum gilt als Zoonoseerreger. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß Isolate von verschiedenen Tierarten und vom Menschen genetische Unterschiede aufweisen (XIAO, 1999).

Die Diagnose erfolgt durch Anreicherungsverfahren aus frisch abgesetztem Kot anhand der Größe und des Sporulationszustands nachgewiesener Oozysten (MEHLHORN, 1993).

Tabelle 2.1.2: Nachweishäufigkeit verschiedener Enteroparasiten beim Hund

Enteroparasitenart	Nachweishäufigkeit [%]		
	(1)	Würfe (2)	Mutterhündinnen (2)
<i>Toxocara canis</i>	6,9	67	45
<i>Giardia spp.</i>	6,0	-	-
<i>Isospora spp.</i>	4,2		
• <i>Isospora burrowsi</i>		36	24
• <i>Isospora canis</i>		16	8
<i>Sarcocystis spp.</i>	3,0	12	19
Ancylostomen	2,5	6	7
<i>Trichuris vulpis</i>	2,5	6	-
<i>Toxascaris leonina</i>	1,1	3	8
<i>Dipylidium caninum</i>	1,1	-	-
Taenien	1,0	-	-
<i>Hammondia heydorni</i>	0,2	7	6

(1) Anteil positiver Proben von 3329 in den Jahren 1984 -1991 am Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover untersuchten caninen Kotproben (EPE et al., 1993)

(2) Anteil oocystenausscheidender Würfe bzw. Mutterhündinnen von 100 untersuchten Hundefamilien aus Süddeutschland (GOTHE u. REICHLER, 1990)

2.1.2 Bakterielle Durchfallerreger

Die bakteriellen Durchfallerreger werden in fakultativ pathogene und obligat pathogene Keimarten unterteilt. Fakultativ pathogene Keime wie z.B. *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, Staphylokokken und Clostridien verursachen nur bei einer Störung des mikroökologischen Gleichgewichts Durchfallsymptome. In einem intakten physiologischen Darmmilieu werden sie im Gegensatz zu obligat pathogenen Keimen in der Regel symptomlos toleriert.

Zu den obligat pathogenen Keimen gehören enteropathogene Stämme der Arten *Escherichia (E.) coli* (siehe Kapitel 2.2), *Campylobacter (C.) spp.*, *Yersinia (Y.) spp.* und *Salmonella (S.) enterica* (SELBITZ, 1992). Da Salmonellen und Yersinien in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kotproben nachgewiesen werden konnten, sollen diese Keime im Folgenden kurz beschrieben werden.

2.1.2.1 Yersinien

Yersinien sind gramnegative, gelegentlich kokkoide Stäbchenbakterien, deren Beweglichkeit auf einen Temperaturbereich von 22-28°C beschränkt ist. Die Gattung *Yersinia* besteht aus den Arten *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. rhodei*, *Y. aldovae*, *Y. mollarettii* *Y. bercovieri* und *Y. ruckeri*.

Y. pestis ist der Erreger der Pest beim Menschen. *Y. pseudotuberculosis* und bestimmte Serovaren von *Y. enterocolitica* verursachen Yersiniosen bei Mensch und Haussäugetier. *Y. ruckeri* ist als Erreger der Rotmaulseuche bei Salmoniden beschrieben. Bei den übrigen Yersinienarten handelt es sich um apathogene Umweltkeime mit gelegentlich saprophytärer Lebensweise (ALEKSIC´ u. BOCKEMÜHL, 1990).

Y. pseudotuberculosis verursacht meist subakut bis chronisch verlaufende Allgemeininfektionen mit nekrotischen Herden in Organen und Darmlymphknoten. Seuchenhafte Erkrankungen treten vor allem in Nagetierzuchten, bei Zootieren und in

Geflügelhaltungen auf. Bei Wildtieren, Nutz- und Heimtieren stehen Einzeltierkrankungen und latente Infektionen im Fordergrund. *Y. pseudotuberculosis* besitzt eine hohe Tenazität und kann in der Umwelt über Monate persistieren. Als Erregerreservoir gelten Nager und Wildvögel. Bei Hunden konnte *Y. pseudotuberculosis* ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch handelte es sich ausschließlich um gesunde Tiere, Krankheitsfälle sind nicht beschrieben (FUKUSHIMA et al., 1984; SHERDING U. BURROWS, 1992).

Y. enterocolitica kommt bei allen warmblütigen Wild- Nutz- und Heimtieren, sowie bei Fischen, Schalentieren und Reptilien vor, wobei aber nur wenige Serovaren als pathogen einzustufen sind. Menschen erkranken in erster Linie durch die Serogruppen O3, O5, O27 und O9 (HEESEMANN u. KARCH, 1995).

Bei gesunden Hunden konnte *Y. enterocolitica* mit einer Prävalenz von 1-6% nachgewiesen werden (WOOLEY et al., 1980; YANAGAWA et al., 1978). Durchfallerkrankungen sind in Einzelfällen ebenfalls beschrieben (PAPAGEORGES et al., 1983; FARSTADT et al., 1976).

Beim Menschen verursacht *Yersinia enterocolitica* fieberhafte Allgemeinstörungen, denen Durchfälle folgen. Darüber hinaus können durch diesen Erreger immunpathologische Reaktionen wie Arthritiden und Erythema nodosum hervorgerufen werden (HEESEMANN u. KARCH, 1995).

Die Pathogenität von Yersinien ist an das Vorhandensein eines Virulenzplasmids gebunden, das für mehr als 15 Proteine kodiert die als Yop (*Yersinia* outer proteins) bezeichnet werden und unter anderem für die Serum- und Phagozytoseresistenz, für die Kollagenbindung und für die Zytotoxizität verantwortlich sind. Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind ein chromosomal kodiertes hitzestabiles Enterotoxin, ein Invasin und ein Eisenaufnahmesystem (HEESEMANN, 1990).

Zur Anzucht von Yersinien werden verschiedene feste Nährböden wie z.B. MacConkey-Agar oder Cefsulidin-Irgasan-Novobiocin-Agar verwendet. Die Anreicherung erfolgt in verschiedenen Flüssigmedien, die für 2-21 Tage bei 22-29°C bebrütet werden. Um pathogene von apathogenen Stämme abzugrenzen muß der Erregersolierung eine Serotypisierung und Biotypisierung folgen. Bei Yersiniosefolgeer-

krankungen wie Arthritis oder Erythema nodosum kann die Verdachtsdiagnose durch serologische Methoden, wie die Widal-Agglutination bestätigt werden. Außerdem steht ein klassenspezifischer Immunoblot unter Verwendung von plasmidkodierten Antigenen zur Verfügung (ALEKSIC u. BOCKEMÜHL, 1990; HEESEMANN u. KARCH, 1995).

2.1.2.2 Salmonellen

Salmonellen sind gramnegative, bewegliche Stäbchenbakterien, die nach aktueller Nomenklatur überwiegend der Art *S. enterica* angehören. Anhand antigener Oberflächenstrukturen erfolgt eine Einteilung in Serovaren, wobei Serovaren mit gleichen Hauptoberflächenantigenen zu Gruppen zusammengefaßt werden (MC WHORTER-MURLIN u. HICKMANN-BRENNER, 1994; siehe Tabelle 2.1.3).

Derzeit sind etwa 2300 Salmonellen - Serovaren bekannt, von denen jedoch nur etwa 10-15 als Krankheitserreger bei Haussäugetieren und beim Menschen Bedeutung erlangt haben (MEYER, 1999).

Aus epidemiologischer Sicht wird zwischen speziesadaptierten und nicht speziesadaptierten Serovaren unterschieden. Speziesadaptierte Serovaren wie z.B. *S. Abortusequi* (Pferd), *S. Gallinarum-Pullorum* (Huhn) oder *S. Typhi* (Mensch) verursachen bei der betreffenden Tierart typhoide Erkrankungen, sog. primäre Salmonellosen. Bei anderen Tierarten sind sie dagegen nur selten anzutreffen. Beim Hund konnten bisher keine speziesspezifischen Serovaren nachgewiesen werden (AMTSBERG u. KIRPAL, 1978).

Nicht speziesadaptierte Serovaren mit geringer Virulenz sind z.B. *S. Agona*, *S. Infantis* oder *S. Hadar*. Sie treten nur sporadisch auf und verursachen nur in Einzelfällen klinisch manifeste Salmonellosen.

Zu den wichtigsten Zoonoseerregern gehören *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, die den weitaus überwiegenden Anteil der Salmonelleninfektionen verursachen und schwere Erkrankungen mit Todesfällen hervorrufen können (MEYER, 1999).

In einer Untersuchung von WEBER (1983) an gesunden Hunden in Nordbayern waren 2,0 - 18,9% der Kotproben *Salmonella*-positiv. Nachgewiesen wurden unter anderem *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* und *S. Dublin*.

Nach einer Statistik des Landesuntersuchungsamts für Gesundheitswesen Nordbayern waren in Nordbayern in den Jahren 1975 - 1994 in 3,45% von 2985 untersuchten Hundekotproben Salmonellen nachzuweisen. Die Isolate gehörten zu 32 verschiedenen Serovaren, wobei *S. Typhimurium* mit 33% am häufigsten vorkam (WEBER et al., 1995). Nach statistischen Erhebungen des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin waren 1996 bei 1,6% von 8812 untersuchten Hunden in Deutschland Salmonellen festzustellen. 16% der Kotproben waren positiv für *S. Enteritidis* und 43% für *S. Typhimurium*. *S. Dublin* konnte nicht nachgewiesen werden (HARTUNG u. HELMUTH, 1998).

Bei landwirtschaftlich genutzten Tieren und beim Menschen stellen Salmonellose ein globales Gesundheitsproblem dar. Ab Mitte der achtziger Jahre war europaweit ein deutlicher Anstieg der Salmonelleninfektionen zu beobachten, der in Deutschland 1992 mit 195 400 gemeldeten Krankheits- und 229 Todesfällen beim Menschen einen vorläufigen Höhepunkt erreichte (MEYER, 1999).

Beim Hund werden Salmonellose dagegen nur selten und meist im Zusammenhang mit prädisponierenden Faktoren wie Streß, Primärerkrankungen, Hospitalismus, chirurgischen Eingriffen oder Behandlung mit Glukokortikoiden oder Chemotherapeutika klinisch manifest (NIEMAND u. SUTER, 1994).

Grundsätzlich können vier Verlaufsformen unterschieden werden. 1. Die inapparente Infektion 2. die Salmonellen-Gastroenteritis, gekennzeichnet durch wäßrigen oder schleimigen in schweren Fällen blutigen Durchfall mit Vomitibus, Tenesmus, Fieber, Anorexie, Abgeschlagenheit und fortschreitender Dehydratation, 3. die endotoxische oder septische Verlaufsform mit schweren Allgemeinstörungen und kardiovaskulären Schocksymptomen und 4. die Organmanifestation mit fokalen Nekrosen, Polyarthritis, Pneumonie und ZNS-Störungen. (SHERDING U. BURROWS, 1992; NIEMAND u. SUTER, 1994).

Die Übertragung erfolgt in erster Linie durch kontaminierte Futter- und Lebensmittel. Aufgrund der relativ hohen infektiösen Dosis von mindestens 10^5 - 10^6 Keimen kommt es in der Regel nur dann zur Infektion, wenn sich der Erreger nach der Primärkontamination im Futter- oder Lebensmittel vermehren konnte. Schmierinfektionen sind ebenfalls beschrieben, spielen aber nur eine untergeordnete Rolle (HARTUNG u. HELMUT, 1997).

Wesentliche Virulenzeigenschaften pathogener Salmonellenstämme sind zum einen ihre Fähigkeit zur Zellinvasion und intrazellulären Lebensweise und zum anderen ihre Fähigkeit, Abwehrmechanismen des Körpers überwinden und darüber hinaus sogar Zellen des körpereigenen Immunsystems als Vehikel zur systemischen Ausbreitung benutzen zu können.

Im Mausmodell sind spezialisierte Enterozyten auf den Peyerschen Platten des Jejunums, sog. M-Zellen primäre Zielzellen der Invasion. Bei anderen Versuchstieren wie Kaninchen, Kälbern und Schweinen konnte dieser Zelltropismus jedoch nicht festgestellt werden (JONES et al., 1994; GIANELLA et al., 1973; SMITH u. JONES, 1967). Unter natürlichen Bedingungen besiedeln Salmonellen wahrscheinlich hauptsächlich das Colon, wo sie schwere Epitheldefekte und Entzündungsreaktionen in der Lamina propria und den Mesenteriallymphknoten verursachen (MC GOVERN u. SLAVUTIN, 1979).

Die initiale Anheftung an Enterozyten erfolgt wahrscheinlich tierart- und zellspezifisch über verschiedene Fimbrien. Bei *S. Typhimurium* konnten bisher folgende vier Typen identifiziert werden, Typ 1 (Fim) -Fimbrien mit noch ungeklärter Funktion, außerdem long polar (LP), plasmid encoded (PE) und thin aggregative (curli) -Fimbrien (BÄUMLER et al., 1997). Curli - Fimbrien ermöglichen den Bakterien neben der Anheftung an Wirtszellen auch die Bildung von Konglomeraten, was das Überwinden der Säurebarriere des Magens erleichtert (COLLINSON et al., 1993).

Die Fähigkeit der Salmonellen, in Enterozyten einzudringen ist an das Vorhandensein eines Invasionsplasmids geknüpft. Dieses Plasmid kodiert unter anderem für verschiedene Komponenten eines in seiner Funktionsweise noch ungeklärten Typ III - Sekretionssystems und für Effektorproteine, die zur Invasion notwendige Umstruk-

turierungsprozesse im Zytoskelett der Wirtszellen stimulieren (GALÁN u. CURTISS, 1989; FINLAY et al., 1991). Außerdem plasmidkodiert ist das äußeres Membranprotein Rck (resistance to complement Killing), das für die Serumresistenz mancher Salmonellenstämme verantwortlich ist (HACKET et al., 1987).

Die Serumresistenz und die Fähigkeit nach Phagozytose den enzymatischen Abbau in den Makrophagen verhindern zu können, ermöglicht den Salmonellen sich über den Blutstrom im gesamten Organismus auszubreiten und sich in verschiedenen Organen abzusiedeln. Hier können sie über längere Zeit persistieren, ohne klinische Symptome auszulösen (LOOS u. WASSENAAR, 1994).

Die Bedeutung von Entero-, Endo-, und Zytotoxinen bei der Auslösung von Durchfall ist unklar. Wahrscheinlich wird Durchfall vorwiegend durch Prostaglandine verursacht, die während der Entzündungsreaktion in der Darmschleimhaut freigesetzt werden. Prostaglandine erhöhen die Adenylatzyklaseaktivität, was zu einer verminderten Na^+ -Rückresorption und vermehrten Cl^- -Sekretion der Enterozyten führt (GIANELLA et al., 1973).

Zum Nachweis von Salmonelleninfektionen wird eine Kombination aus flüssigen Anreicherungsmedien und festen Selektivnährböden verwendet. Die Identifizierung erfolgt mittels spezifischer Antisera in der Objektträgeragglutination (BISPING u. AMTSBERG, 1988). Für epidemiologische Fragestellungen stehen aufwendigere Verfahren wie Lysotypie, Elektrotypisierung, DNS-Fingerprinting, Plasmid-, Outer-Membran-Protein- und Resistenzprofilanalyse zur Verfügung (HELMUTH et al., 1990)

Tabelle 2.1.3: Wichtige Salmonella - Serovaren

Gruppe	Haupt-O-Antigen	Serovar	Wirt
Gruppe B	O:4	<i>S. Typhimurium</i>	Zoonoseerreger
		<i>S. Heidelberg</i>	nicht speziesspezifisch
		<i>S. Abortusequi</i>	Pferd (Genitaltrakt)
		<i>S. Abortusovis</i>	Schaf (Genitaltrakt)
		<i>S. Paratyphi B</i>	Mensch
Gruppe C1	O:7	<i>S. Choleraesuis</i>	Schwein, aber auch andere Spezies
		<i>S. Infantis</i>	nicht speziesspezifisch
Gruppe D1	O:9	<i>S. Typhi</i>	Mensch
		<i>S. Enteritidis</i>	Zoonoseerreger
		<i>S. Dublin</i>	Rind, aber auch andere Spezies

2.2 Darmpathogene *Escherichia coli*

Enterobacteriaceen der Art *Escherichia coli* gehören zu den in bakteriologischen Untersuchungen am häufigsten angezüchteten Keimen. Es handelt sich um gramnegative, fakultativ anaerob wachsende Stäbchenbakterien, benannt nach ihrem Erstbeschreiber, dem deutschen Mediziner Theodor Escherich. Bei den meisten homoiothermen Tierarten einschließlich des Menschen bewohnen *E. coli* - Bakterien das Dickdarmmlumen, wo sie als wichtiger Teil der physiologischen Darmflora wesentlich Anteil am ungestörten Ablauf der Verdauungsfunktionen haben (DRESAR u. HILL, 1974). An ihrem natürlichen Standort erfüllen *E. coli* - Bakterien vielfältige Aufgaben: Sie halten das anaerobe Milieu im Dickdarmmlumen durch Sauerstoffverbrauch aufrecht und ermöglichen somit den Anaerobiern das Überleben. Durch die Produktion von bakteriziden Substanzen, sogenannten Colicinen leisten Colibakterien einen wichtigen Beitrag zur mikrobiellen Barriere des Intestinaltraktes. Außerdem schreibt man *E. coli* einen Einfluß auf die Zytokinregulation und damit Funktionalität des darmassoziierten Immunsystems zu (KARCH 1999, persönl. Mitt.).

Allerdings ist bei dieser Bakterienspezies auch ein breites Spektrum von pathogenen Wirkungstypen bekannt: uropathogene, sepsis- und meningitis- verursachende sowie verschiedene darmpathogene *E. coli* (ØRSKOV u. ØRSKOV, 1985; BEUTIN, 1990). Diese pathogenen Varianten unterscheiden sich von den apathogenen Colistämmen durch die Präsenz von Virulenzgenen. Die Vielfalt der Krankheitsbilder und die immer bessere Aufklärung der Pathogenitätsmechanismen, führte zu der Unterteilung der darmpathogenen *E. coli* in bisher 5 Untergruppen (siehe Tabelle 2.2.1). Darüber hinaus sind weitere darmpathogene *E. coli* - Stämme bekannt, die keiner der genannten Gruppen zugeordnet werden können.

Tabelle 2.2.1: Einteilung darmpathogener *E. coli*

Gruppe	Virulenzfaktoren		Erkrankung	bekannt seit
	Adhäsine	Toxine		
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	BFP, Intimine		Dysenterie bei Säuglingen und Jungtieren	NETER et al., 1955
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	CFAI,CFAII F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41	LT, STa, STb	Reisediarrhoe beim Menschen, cholraähnliche Diarrhoe bei Mensch und Tier	SACK et al., 1971
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Ipa	EIET ShET	ruhrähnliche Diarrhoe beim Menschen	DU PONT et al., 1971
Enter aggregative <i>E. coli</i> (EAEC)		EAST1 Zytotoxin Hämolysin	Säuglingsenteritis, kindliche Entwicklungsstörungen beim Menschen	VIAL et al., 1988
Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	Intimine	Stx1, Stx2, Stx2-Varianten, EHEC-Hly	HUS, HC, TPP beim Menschen Ödemkrankheit beim Schwein	RILEY et al., 1983

BFP = bundle forming pilus

CFA = colonization factor antigen

EAST-1 = Enter aggregatives hitzestabiles Toxin - 1

E-Hly = EHEC - Hämolysin

EIET = Enteroinvasives Enterotoxin

F = Fimbrien - Antigene

HC = hämorrhagische Colitis

HUS = hämolytisch - urämisches Syndrom

Ipa = invasion plasmid antigen

K = Kapselantigen

LT = Hitzelabiles Toxin

P = Pilusantigen

ShET = Shigellenenterotoxin

ST = Hitzestabiles Toxin

Stx = Shigatoxin

TTP = thrombotisch - thrombozytopenische Purpura

2.2.1 Darmpathogene *Escherichia coli* bei Hunden

Bei Hunden konnten bisher EPEC, ETEC und STEC nachgewiesen werden. Die isolierten Stämme gehörten in der Regel jedoch nicht zu den aus der Humanmedizin bekannten Serovaren und wiesen meist kein vollständiges Virulenzmuster auf.

EPEC - Bakterien sind durch folgende Virulenzmerkmale charakterisiert: Sie bilden keine Shiga- oder Enterotoxine. Wie EHEC produzieren sie jedoch chromosomal kodierte Intimine, die es ihnen ermöglichen, sog. attaching and effacing (AE) - Läsionen an der Darmwand zu verursachen. Die kodierenden Gene werden als *E. coli* attaching and effacing (*eae*) - Gene bezeichnet (siehe Kapitel 2.2.4.1). Die meisten EPEC besitzen ein sog. EPEC- adherence factor (EAF) - Plasmid, das für bündelförmige Pili mit Homologie zur Familie der Typ 4 Fimbrienadhäsine kodiert. Mittels solcher sog. bundle forming pili (BFP), sind sie in der Lage, sich in Haufen an Gewebekulturzellen anzulagern. Das entstehende Adhärenzmuster wird als localized adherence (LA) bezeichnet. Welche Rolle BFP als Anheftungsfaktoren an Enterozyten spielen ist noch unklar (LAW, 1994; NATARO u. KAPER, 1998).

Da die kodierenden Gene für die genannten Virulenzfaktoren bekannt sind, stehen zum Nachweis der EPEC genotypische Verfahren wie die DNS-DNS-Hybridisierung und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Verfügung. Die Diagnostik richtet sich dabei in erster Linie auf den Nachweis von *eaf*-Gensequenzen, ergänzt durch den Nachweis von *eae*- und *bfp*- Genen (KAPER, 1996). Attaching and effacing -Läsionen können mittels des Fluoreszenz-Aktin-Färbungstests (FAS-Test) nachgewiesen werden. Dieser Test ist jedoch sehr arbeitsintensiv und deshalb für die Routinediagnostik nicht geeignet (KNUTTON et al., 1989).

Das durch EPEC verursachte Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch chronisch rezidivierende wässrige Durchfälle mit Schleimbeimengungen bei Kindern unter 6 Monaten, sowie Enteritiden bei neugeborenen Kälbern, Kaninchen, Lämmern

und Ferkeln (KAPER, 1996; MOON et al., 1983; MOXLEY u. FRANCIS, 1986; JANKE, 1989).

Über das Vorkommen von EPEC bei Hunden ist wenig bekannt. Bei in der Mehrzahl unter 3 Monate alten durchfallkranken Hunden konnten *eae*-positive *E. coli*-Stämme nachgewiesen werden, die zum Teil zusätzlich *eaf*- und *bfp*-Gensequenzen trugen. Es handelte sich jedoch überwiegend nicht um beim Menschen vorkommende EPEC - Serovaren (JANKE et al., 1989; DROLET et al., 1994; BEAUDRY et al., 1996).

Zum Virulenzmuster der ETEC gehören verschiedene plasmidkodierte Fimbrienadhesine, die für die Wirtsspezifität der Erreger verantwortlich sind (siehe Tab. 2.2.1). Außerdem produzieren ETEC ebenfalls plasmidkodierte hitzelabile (LT) und hitzestabile (ST) Enterotoxine. Die hitzelabilen Enterotoxine werden in LTI und LTII eingeteilt. Sie bestehen aus fünf rezeptorbindenden B-Untereinheiten, die an die GM₁-Gangliosid-Rezeptoren der Enterozyten binden und einer A-Untereinheit mit Enzymwirkung. Die A-Untereinheit aktiviert zytoplasmatische Adenylatzyklen, was zu einer intrazellulären Anreicherung von zyklischem AMP und damit zu einer gesteigerten Sekretion der Kryptenzellen und einer verminderten Absorptionsleistung der Zottenspitzenzellen der Darmschleimhaut führt. Die hitzestabilen Toxine können ebenfalls in zwei Typen, STa und STb eingeteilt werden, wobei STa Toxine ihrerseits nochmals in ST-porcine (STIa) und ST-human (STIb = STh) unterteilt werden. ST binden an apikale Guanylatzyklen und stimulieren deren Aktivität. Der daraus resultierende Anstieg des zyklischen GMP führt ebenfalls zu einer gesteigerten Sekretions- und verminderter Absorptionsleistung der Enterozyten (NATARO et al., 1998; GYLES, 1994).

Zum Nachweis der ETEC stehen folgende Tests zur Verfügung. Toxingene können mittels PCR oder Kolonienblot - Hybridisierung und die Toxine mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Toxinaktivität werden biologische Testsysteme wie der Babymaustest, der

Darmligaturtest und der Y-1 Adrenalinzell - Test eingesetzt (DEAN et al., 1972; DONTA et al., 1974; YOLKEN et al., 1977; CRYAN, 1990).

Klinisch manifeste ETEC-Infektionen verlaufen choleraähnlich, gekennzeichnet durch hochgradig wässrige Diarrhoe mit Dehydratationssymptomatik. Betroffen sind in erster Linie Jungtiere wie Ferkel, Lämmer und Kälber. Beim Menschen erkranken vor allem Kinder in Entwicklungsländern, außerdem lassen sich etwa 70% der Reisediarrhöen auf diese Erreger zurückführen.

Bei gesunden Hunden konnten ETEC - Bakterien nicht nachgewiesen werden. Durchfallkranke Hunde waren dagegen zu 2,7 - 31,1% der Fälle mit diesen Erregern infiziert. Betroffen waren überwiegend Jungtiere. Die isolierten Stämme produzierten hitzestabile Toxine. (RICHTER et al., 1984; OLSON et al., 1985; HAMMERMUELLER et al., 1995). Vereinzelt konnten auch ETEC - Stämme isoliert werden, deren Toxine eine ähnliche biologische Aktivität zeigten wie die hitzelablen Toxine, ohne jedoch mit diesen identisch zu sein (WASTLHUBER, 1998). Keiner der Stämme besaß die Fimbrienantigene K88 (F4), K99 (F5), CFAI (F2) und CFAll (F3), ausgenommen einige O42:H37 ETEC- Stämme, die das Fimbrienantigen K99 aufwiesen, das häufig bei bovinen ETEC vorkommt (RICHTER et al., 1984; Olson et al., 1985). Alle nachgewiesenen caninen ETEC - Stämme gehörten zu Serogruppen, die bei anderen Haussäugetieren und beim Menschen nicht oder nur selten vorkommen (WOLF, 1997).

Bei EHEC handelt es sich definitionsgemäß um Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC), die beim Menschen Krankheiten hervorrufen (BEUTIN et al. 1994). Als für den Menschen virulentester Serotyp gilt EHEC O157:H7. Bei Hunden sind zwei Fälle einer EHEC O157:H7 - Infektion beschrieben. In einem Fall handelte es sich um einen gesunden Hund, im andern Fall sind keine Angaben zum Gesundheitszustand bekannt (TREVINA, 1996; KHAKHRIA et al., 1990).

STEC konnten bei gesunden und durchfallkranken Hunden etwa gleich häufig nachgewiesen werden. Gesunde Hunde waren zu 3,2-12,3% STEC- Ausscheider, Hunde mit Durchfall schieden STEC in 8,9% der Fälle aus (BEUTIN et al.,

Literaturübersicht

1993; BEUTIN et al., 1995; GALLIEN et al., 1994; HAMMERMUELLER et al., 1995). (Virulenzfaktoren und Nachweismethoden der STEC siehe Kapitel 2.2.4).

2.2.2 Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)

EIEC zeigen eine enge biochemische und genetische Verwandtschaft zu den Shigellen sowie ein ähnliches Pathogenitätsmodell. Sie dringen in die Epithelzellen des Ileums und des Colons ein und vermehren sich intrazellulär. Dies führt zur Schädigung der Wirtszellen, die schließlich zugrunde gehen. Hieraus resultiert eine heftige entzündliche Reaktion mit Ulzerationen der Darmschleimhaut. Histopathologisch finden sich Mikroabszesse, was sich klinisch in einem ruhrähnlichen Krankheitsbild manifestiert. Es kommt zu hauptsächlich wässrigen Stuhlentleerungen, die in blutige ruhrähnliche Durchfälle übergehen können (DU PONT et al., 1971).

2.2.2.1 Pathogenitätsfaktoren

EIEC sind nicht motil und biochemisch deutlich weniger aktiv als andere *E. coli* (TOLEDO et al., 1983). Die Invasivität ist an den Besitz eines ca. 200 kb großen Plasmids gekoppelt. Dieses Plasmid wurde pINV genannt und findet sich auch bei den Shigellen (HARRIS et al., 1982). Das Plasmid kodiert unter anderem für sogenannte Ipa-Proteine (invasion plasmid antigen), wobei die Funktionsweise dieser Proteine noch nicht eindeutig geklärt ist (HALE 1991).

Zur Pathogenität der EIEC trägt außerdem noch die Produktion von Enterotoxinen, EIET und ShET bei. Das kodierende Gen *sen* (shigella enterotoxin-Gen) ist ebenfalls plasmidkodiert (NATARO et al., 1995).

2.2.2.2 Diagnostik

Die Diagnose der EIEC gelang früher nur über den sogenannten Keratokonjunktivtest an Meerschweinchen (Sereny-Test) (SERENY, 1957). Aus Tierschutzgründen wird dieser Test in Deutschland nicht mehr durchgeführt.

Inzwischen stehen Gensonden zur Verfügung, die einen Teil der DNA-Sequenz des INV-Plasmids erkennen. Der Nachweis der Invasionsgene kann auch mittels einer PCR erfolgen (FRANKEL et al., 1990). Es bleibt aber zu beachten, daß alle genannten Nachweismöglichkeiten genauso positiv ausfallen, wenn Shigellen im Untersuchungsmaterial vorhanden sind, denn Shigellen und EIEC zeigen weitreichende genetische Gemeinsamkeiten. Auf die grundsätzliche biochemische Identifizierung der Krankheitserreger als *E. coli* oder als Shigellen kann also nicht verzichtet werden (WOOD et al., 1986; TAYLOR et al., 1988).

EIEC besitzen in der Regel keine Kapselantigene. Ihre Verbreitung ist auf wenige *E. coli* - Serovaren beschränkt. Die meisten EIEC können folgenden Serogruppen zugeordnet werden: O28:H⁻, O124:H30, O136:H⁻, O144:H⁻ und O173:H⁻ (ØRSKOV et al., 1991).

2.2.2.3 Epidemiologie

Epidemiologische Untersuchungen lassen vermuten, daß etwa 1-4% der Durchfallerkrankungen beim Menschen durch EIEC verursacht werden, wobei kein Unterschied zwischen den Entwicklungsländern und Europa zu bestehen scheint (BEUTIN, 1990).

Die Übertragung der EIEC erfolgt entweder durch Schmierinfektion von Mensch zu Mensch oder über kontaminiertes Trinkwasser, seltener über Lebensmittel. Heute ist noch unklar, ob der Mensch das einzige Reservoir für EIEC darstellt oder ob es noch weitere Wirte gibt. Bei Hunden konnten EIEC bisher nicht nachgewiesen werden (BEUTIN, 1999).

2.2.3 Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC)

Diese Gruppe der darmpathogenen *E. coli* wurde 1987 anhand des charakteristischen Phänotyps im HEp-2-Zellen-Adhärenztest identifiziert. Im HEp-2-Zellen-Adhärenztest zeigen EAEC das typische aggregative Adhärenzmuster, bei dem die Bakterien an der Oberfläche der HEp-2 Zellen wie auch zellunabhängig backsteinartig geschichtete Konglomerate bilden (NATARO et al., 1992, VIAL et al., 1988).

In vivo heften sich EAEC an die Schleimhautepithelzellen des Darms, wo sie eine heftige Schleimproduktion induzieren. Darüber hinaus wurden an den betroffenen Epithelzellen des Darms zytotoxische Effekte beschrieben. Im Tiermodell beobachtete man an der infizierten Darmschleimhaut von Ratten, Kaninchen und Schweinen verkürzte Mikrovilli, hämorrhagische Nekrosen auf den Spitzen der Villi, eine milde Entzündung mit Ödem und mononukleärer Infiltration der Submukosa (VIAL et al., 1988; TZIPORI et al., 1992).

Beim Menschen, insbesondere bei Kindern, verursachen EAEC persistierende, wäßrige Durchfallerkrankungen. Ausbrüche von EAEC-Infektionen mit zum Teil tödlichem Ausgang sind beschrieben (ESLAVA et al., 1993).

Außer ihrer Darmpathogenität scheinen die EAEC aber noch eine weitere möglicherweise viel bedeutendere Eigenschaft zu besitzen: EAEC werden mit kindlichen Wachstumsverzögerungen in Verbindung gebracht. Die Besiedlung der Darmschleimhaut mit EAEC scheint auch ohne Durchfallerkrankung mit vermindertem Längenwachstum sowie geringerem Gewicht der Patienten korreliert zu sein (KARCH 1999, persönl. Mitt.).

2.2.3.1 Pathogenitätsfaktoren

Die Virulenz der EAEC liegt auf einem 55 bis 65 MDa großes Plasmid (VIAL et al., 1988). Oft besitzen die EAEC noch weitere kleinere Plasmide. Das größere Plasmid

ist für die Ausbildung der aggregativen Adhärenz verantwortlich und enthält die genetische Information für die Produktion von Fimbrien. Plasmidkodiert ist auch die Produktion eines hitzestabilen Enterotoxins und eines hitzelabilen Toxins (SAVARINO et al., 1991 und 1993; NATARO et al., 1992 und 1993). Das hitzestabile Enterotoxin (EAST 1) der EAEC ist ein Polypeptid mit 38 Aminosäuren und vier Cysteinresten. Die toxische Aktivität von EAST 1 ist mit einer Erhöhung des zyklischen GMP-Spiegels an der Darmschleimhaut assoziiert. Man geht davon aus, daß EAST 1 die Guanylatzyklase stimuliert, ebenso wie STa, das Enterotoxin der ETEC, zu dem EAST 1 signifikante Sequenzhomologien aufweist. EAST 1 ist nicht spezifisch für die EAEC, das Toxin konnte bisher auch bei ETEC, EPEC, EHEC O157:H7 und diffus-adherenten *E. coli* (DAEC) nachgewiesen werden (YAMAMOTO et al., 1997). In vitro haben EAEC die Eigenschaft, Erythrozyten verschiedener Herkunft zu agglutinieren. Ein klinisches Korrelat wurde aber noch nicht beschrieben. In engem Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Hämagglutination scheint bei den EAEC die Ausbildung eines sogenannten Kahmhäutchens an der Oberfläche von Kulturen in Flüssigmedium zu sein. Es wird als Ausdruck der Anheftung der EAEC aneinander verstanden und findet sich bei keinem anderen darmpathogenen *E. coli*. Die Ausbildung dieses Kahmhäutchens ist nur bei denjenigen Stämmen nachzuweisen, die die Fähigkeit zur Hämagglutination haben. Weiterhin wurden bei EAEC ein Zytotoxin von 108 kDa gefunden und ein Kontakt-Hämolysin beschrieben (ESLAVA et al., 1993; NAVARRO-GARCIA et al., 1998).

Am häufigsten finden sich EAEC bei Stämmen der Serogruppe O44. Gewisse H-Antigene kommen bei den EAEC regelmäßig vor: H33, H10 und H2. Abgesehen von wenigen Ausnahmen finden sich EAEC nicht innerhalb von Serogruppen, die für andere darmpathogene *E. coli* typisch sind. Allerdings wurde ein Shigatoxinproduzierender *Escherichia coli*-Stamm O111:H2 beschrieben, der im Rahmen eines hämolytisch-urämischen Syndroms isoliert wurde und aggregative Adhärenz an HEp-2 Zellen zeigte und mit der EAEC Gensonde pCVD₄₃₂ hybridisierte. Hier findet sich eine bisher nicht bekannte Kombination von Virulenzfaktoren (MORABITO et al., 1998).

Die gegenwärtige Vorstellung der Pathogenese läßt sich in einem dreistufigen Modell darstellen. Zunächst heften sich die EAEC mit Hilfe ihrer speziellen Adhärenzfimbrien an die Mukosazellen. Dann initiieren die Keime eine Schleimproduktion, so daß die Epithelzellen schließlich von einer dicken mukösen Auflagerung bedeckt sind. Eingebettet in die Schleimauflagerung können die EAEC schlecht ausgeschieden werden, was die persistierende Kolonisierung der Darmschleimhaut erleichtert. Außerdem führt die Auflagerung auf der Mukosa zu einer schlechten Nährstoffdiffusion im Sinne einer Malabsorption. Im dritten Schritt kommt es zur Sezernierung von Zytotoxinen und dadurch zum endgültigen Zellschaden der intestinalen Mukosa (LAW u. CHART, 1998).

2.2.3.2 Diagnostik

EAEC können inzwischen nicht nur über den langwierigen HEp-2-Zellen-Adhärenztest nachgewiesen werden, sondern auch mittels zweier Gensonden. Außerdem wurde eine PCR entwickelt, die ein Screening innerhalb weniger Stunden ermöglicht (BAUDRY et al., 1990; SCHMIDT et al., 1995).

2.2.3.3 Epidemiologie

In den Entwicklungsländern sind EAEC weit verbreitet (VIAL et al., 1988). Das Vorkommen der EAEC beschränkt sich aber keineswegs auf diese Länder. Mehrere Studien aus den Industrienationen belegen auch hier die Verbreitung der EAEC. In Deutschland wurde die Häufigkeit von EAEC als Verursacher von Durchfällen im Kindesalter mit 2 % angegeben (SCOTLAND et al., 1991; SCHMIDT et al., 1994; HUPPERTZ et al., 1997). Bei Hunden konnten EAEC bisher nicht nachgewiesen werden (BEUTIN, 1999).

2.2.4 Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

EHEC gehören zur Gruppe der in der Natur weit verbreiteten Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC). In den angelsächsischen Ländern werden die STEC auch als Verotoxin-produzierende *E. coli* (VTEC) bezeichnet. Unter EHEC versteht man STEC, die in der Lage sind, beim Menschen Krankheiten hervorzurufen (BEUTIN et al. 1994). Erstmals beschrieben wurden die EHEC im Zusammenhang mit zwei Ausbrüchen von hämorrhagischer Colitis (HC) in den USA im Jahre 1982 (RILEY et al. 1983; JOHNSON et al. 1983; WELLS et al. 1983).

EHEC-Infektionen verlaufen meist als wäßriger Durchfall, der aber in etwa 20% der Fälle in die namensgebende hämorrhagische Colitis (HC) übergeht. In den meisten Fällen heilt die HC ohne Residuen ab (BEUTIN u. NIEMER, 1995). Risikopatienten sind ältere Menschen ab 65 Jahren. In dieser Altersgruppe muß mit einer Mortalitätsrate von 15-23% gerechnet werden (GRIFFIN u. TAUXE, 1991).

Außerdem gilt die HC als Risikofaktor für die Ausbildung des lebensbedrohlichen postenteritischen hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS). Besonders gefährdet sind Kinder unter 5 Jahren. Ca. 7-8% der unter fünfjährigen Kinder mit HC erkranken am HUS (BOCKEMÜHL et al., 1997). Das HUS manifestiert sich etwa 3-12 Tage nach Beginn des Durchfalls, der zu diesem Zeitpunkt oft bereits abgeklungen ist. Neben einer schweren Niereninsuffizienz kommt es unter Umständen zu zerebralen Krampfanfällen und multipler Organbeteiligung. Etwa 50% der Patienten werden dialysepflichtig. (BEUTIN u. NIEMER, 1995). In ca. 10 % der Fälle verläuft die Erkrankung letal, in weiteren 15 - 30% entsteht ein terminaler Nierenschaden. Permanenter Bluthochdruck, Diabetes mellitus und andere Spätfolgen sind ebenfalls beschrieben (BITZAN et al., 1992; BOCKEMÜHL u. KARCH, 1996).

Vorwiegend Erwachsene können das Krankheitsbild der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) ausbilden, wobei hier neurologische Symptome im Vordergrund stehen (TARR, 1995).

Die Erregerausscheidung bei EHEC-Patienten dauert durchschnittlich 2-3 Wochen (ORR et al., 1994). Eine mehrwöchige asymptomatische Dauerausscheidung ist ebenfalls beschrieben (TARR, 1995).

In sieben Staaten Europas wurden Reihenuntersuchungen an HUS-Patienten durchgeführt, die zeigten, daß diese in 61 - 93 % aller Fälle auf EHEC-Infektionen zurückzuführen sind (BIELASZEWKA et al., 1996; BITZAN et al., 1993; DECLUDT et al., 1997; PIÉRARD et al., 1997). Aus elf Ländern wurde von Durchfallerkrankungen berichtet, die mit einer Häufigkeit von 0,3 - 9,3 % auf EHEC zurückzuführen waren (ALLERBERGER et al., 1996; BURNENS et al., 1992; COBELJIC et al., 1995; HUPPERTZ et al., 1996; KARCH et al., 1997; PIERARD et al., 1997).

Bei Tieren verlaufen STEC - Infektionen meistens inapparent. In Einzelfällen ist wässriger, selten blutiger Durchfall bei Ferkeln und Kälbern beschrieben (CRAY u. MOON, 1995; DEAN-NYSTROM et al., 1997).

2.2.4.1 Pathogenitätsfaktoren

EHEC bilden phagenkodierte Shigatoxine und chromosomal kodierte Intimine. Außerdem produzieren viele EHEC-Stämme das plasmidkodierte EHEC-Hämolysin.

Das EHEC-Hämolysin wurde erstmals 1988 unter der Bezeichnung Enterohämolysin als Virulenzmerkmal klassischer EPEC-Stämme der Serovaren O26 und O111 beschrieben (BEUTIN et al., 1988). Diese Stämme konnten später als EHEC identifiziert werden. Weitere Untersuchungen ergaben, daß 89% der EHEC das EHEC-Hämolysin produzierten (BEUTIN et al., 1989). Neuere Untersuchungen belegen jedoch, daß mittlerweile nur noch bei 75% der EHEC die EHEC-Hämolyse nachgewiesen werden kann (BOCKEMÜHL et al., 1997). Das EHEC-Hämolysin ist ein zellassoziertes thermolabiles Hämolysin, das während der stationären Wachstumsphase der Bakterienzellen produziert wird. Es handelt sich um ein ca. 60 kDa großes äußeres Membranprotein, dessen zytolytische Aktivität auf einer induzierten Porenbildung in der Wirtszellmembran beruht. Seine Virulenz wird als eher gering beurteilt. Auf Rinderblutagar, wie er in der bakteriologischen Routinediagnostik Ver-

wendung findet, zeigt das EHEC-Hämolysin keine hämolysierenden Eigenschaften. Zum Nachweis der EHEC-Hämolyse wird Agar verwendet, der 5% gewaschene (fibrinfreie) Schaferythrozyten enthält (BEUTIN et al., 1990).

Neben EPEC und anderen Bakterienarten wie z.B. *Havnia alvei* oder *Citrobacter rodentium* können EHEC an der Darmwand sogenannte attaching and effacing (A/E) - Läsionen hervorrufen (MOON et al., 1983). A/E - Läsionen sind gekennzeichnet durch eine Zerstörung des Mikrovillisaums und eine sehr enge Anheftung der Bakterien an die Enterozytenmembran. Die Darmepithelzellen bilden sockelartige Strukturen, die einzelne Bakterienzellen tassenartig einfassen. Unterhalb der haftenden Bakterien sind die Zytoskelettproteine polymerisiert und verdichtet (KNUTTON et al., 1989).

Die sehr dichte Anheftung der EHEC an die Enterozytenmembran wird durch die Produktion von sogenannten Intiminen ermöglicht (DONNENBERG et al., 1993). Intimine sind bakterielle Oberflächenproteine mit einem Molekulargewicht von 94 kDa (JERSE et al., 1990). Anhand immunologischer Kriterien können die Intimine in die Subtypen α , β , γ , δ und nicht typisierbar eingeteilt werden. Die einzelnen Subtypen sind vermutlich verschiedenen clonalen *E. coli* - Gruppen eindeutig zuzuordnen und wahrscheinlich mitverantwortlich für deren unterschiedliche Virulenz (ADUBOBIE et al., 1998).

Die Intimine werden durch *E. coli* attaching and effacing - Gene (*eae*) kodiert, deren Genort als locus of enterocyte effacement (LEE) bezeichnet wird (KAPER et al., 1996). Die LEE-Region ist Teil einer 35-kbp großen chromosomalen Pathogenitätsinsel. Der G-C-Gehalt des LEE entspricht mit 38,4% etwa dem von Chlamydien-DNA und liegt deutlich unter dem G-C-Gehalt von 50-51% des restlichen Chromosoms. Möglicherweise handelt es sich bei der LEE-Region um ein durch horizontalen Gentransfer aus einem Fremdorganismus übertragenes DNA-Fragment.

Der LEE kodiert außerdem für ein Typ-III-Sekretionssystem (JARVIS et al., 1995). Die sezernierten bakteriellen Proteine werden als *E. coli* secreted proteins (Esp) bezeichnet. Nach der fimbrienvermittelten initialen Anheftung der EHEC an die Entero-

zyten verursachen die Esp eine Aktivierung verschiedener Signalübertragungssysteme und die Phosphorylierung von Wirtszellproteinen (KENNY et al., 1996).

Bisher sind die Proteine EspA, EspB, EspD und EspE beschrieben. EspE wird synonym auch als translocated intimin receptor (Tir) bezeichnet, da EspE in die Wirtszelle eingeschleust und als Intiminrezeptor in deren Zellmembran eingebaut wird. (KENNY et al., 1997).

Untersuchungen mit einem deletionsmutanten EHEC-Clon zeigten, daß EHEC eine offene Lesezone auf dem LEE stromaufwärts der *esp* besitzen, deren Zerstörung die Sekretion der Esp hemmt. Die Lesezone wird als *pas* (protein associated with secretion - Gen) bezeichnet. Das kodierte Protein konnte bei EHEC im Zytoplasma nachgewiesen werden (KRESSE et al., 1998).

Bei EPEC wird die Genexpression der Intimine und anderer Pathogenitätsfaktoren durch den sogenannten *per* locus reguliert, der auf dem 90 kbp großen EPEC-adherence-factor (EAF) -Plasmid lokalisiert ist. EHEC besitzen keinen regulatorischen *per* locus (GÓMEZ-DUARTE u. KAPER, 1995).

Die Produktion von Shigatoxinen gilt als das wichtigste Virulenzmerkmal der EHEC. Für die Toxinbildung kodierende Gene liegen auf temperenten Phagen innerhalb des Bakteriengenoms. Durch Phageninfektion können diese Gensequenzen leicht auf nicht toxinbildende *E. coli* - Stämme übertragen werden (SCOTLAND et al., 1983).

Die Shigatoxine werden wegen ihres zytotoxischen Effekts gegenüber Verozellen (Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze) auch als Verotoxine (VT) bezeichnet. Die Bezeichnung Shiga-like Toxine (SLT) ist ebenfalls noch gebräuchlich. Mittlerweile ist jedoch bekannt, daß diese Toxine nicht nur shigellentoxin-ähnliche Eigenschaften besitzen, sondern in der Aminosäuresequenz weitgehend mit den Shigellentoxinen identisch sind, so daß heute überwiegend die Bezeichnung Shigatoxine (Stx) verwendet wird (KONOWALCHUK et al., 1977; O'BRIAN et al., 1982).

Die Shigatoxine von *E. coli* werden nach immunologischen Kriterien in zwei Klassen eingeteilt. Stx1 zeigt Kreuzreaktion mit Antisera gegen *Shigella-dysenteriae*-Typ1-

Toxin. Bei Stx2 tritt diese Kreuzreaktion nicht auf (ACHESON et al., 1991). Im Gegensatz zu Stx1 handelt es sich bei Stx2 um eine heterogene Gruppe mit verschiedenen Genotypen wie z.B. *stx2*, *stx2d*, *stx2c* und *stx2e*. Die Genotypen sind teilweise wirtsspezifisch. So lassen sich *stx2* und *stx2c* häufig bei STEC von Mensch, Rind und Hund nachweisen, nicht aber bei STEC von Schaf und Ziege (BEUTIN et al., 1995). Stx2e-bildende STEC verursachen die Ödemkrankheit bei Schweinen (WEINSTEIN et al., 1988).

Shigatoxine haben die chemische Struktur von Polypeptiden. Sie sind aus fünf B-Untereinheiten und einer A-Untereinheit aufgebaut. Die A-Untereinheit hat enzymatische Aktivität und verursacht den eigentlichen toxischen Effekt, die B-Untereinheiten bilden die Bindungsstelle. Die Bindung an Eukaryontenzellen erfolgt an Glykolipidrezeptoren. Stx1 und Stx2 binden an das Globotriosyl-Ceramid (Gb3), Stx2e bindet bevorzugt an Globotetraosyl-Ceramid (Gb4) (EDELMAN et al., 1988; DE GRANDIS et al., 1989). Wirtszellen für Shigatoxine sind in erster Linie Gefäßendothelzellen (KAVI et al., 1987).

Der zytotoxische Effekt der Shigatoxine beruht auf einer Hemmung der zellulären Proteinbiosynthese durch katalytische Veränderungen der 28SRNA (JACKSON, 1990). Die zytotoxische Wirkung auf Verozellen ist bei Stx2 ca. 1000 mal niedriger als bei Stx1 (HEAD et al., 1988). Im Mausmodell wirkt Stx2 dagegen deutlich toxischer als Stx1. Die LD50 bei Mäusen ist für Stx2 100-400 mal niedriger als für Stx1, was möglicherweise auf die größere biochemische Stabilität von Stx2 zurückzuführen ist (TESH et al., 1993).

Neben der Zelltoxizität sind weitere Toxinwirkungen beschrieben. So steigern Shigatoxine die Synthese von Tumornekrosefaktor (TNF) in der Niere und erhöhen zusätzlich die Sensitivität der Endothelzellen gegenüber TNF (HAREL et al., 1993). Der synergistische Effekt zwischen Stx und TNF in der Niere konnte im Mausmodell bestätigt und bei Mäusen auch im Gehirn nachgewiesen werden (ISOGAI et al., 1998).

Die Gruppe der EHEC ist durch eine große Vielfalt unterschiedlicher Serogruppen gekennzeichnet. Mittlerweile sind über 200 verschiedene Serovaren bekannt. Die wichtigsten EHEC - Serovaren sind O157:H7, O111:H8, O26:H11, O26:H $\bar{7}$, O103:H2, und O117:H14 (JOHNSON et al., 1996, BOCKEMÜHL et al., 1997; NATARO u. KAPER, 1998). EHEC-assoziierte HUS-Fälle sind zu etwa 60 - 80 % auf die Serogruppe O157 zurückzuführen. Im Gegensatz dazu sind Nicht-O157- Stämme für 80 % der auf EHEC zurückzuführenden Enteritidfälle verantwortlich (HUPPERTZ et al., 1996; KARCH et al., 1997; PIERARD et al., 1997).

2.2.4.2 Diagnostik

Biochemische Methoden sind aufgrund der großen Erregervielfalt nur sehr eingeschränkt einsetzbar. Zum Nachweis von O157:H7-Stämme kann der Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) als Selektivmedium eingesetzt werden, da diese im Gegensatz zu den meisten anderen *E. coli* - Stämmen nicht in der Lage sind Sorbitol zu fermentieren (MARCH u. RATNAM, 1986).

Ausschließlich zum Nachweis von O157-Stämmen verwendet werden kann die immunmagnetische Separation (IMS). Der großer Vorteil dieses Verfahrens ist die sehr hohe Sensitivität (KARCH et al., 1996).

Bei Screeningmethoden, die auch Nicht-O157-Stämme erfassen, werden entweder die Zytotoxizität, oder exprimierte Shigatoxine, oder Shigatoxingene nachgewiesen. Als Zytotoxizitätstest wird der Verozelltest eingesetzt (KONOWALCHUK et al., 1977). Dieser Test ist sehr sensitiv und spezifisch, aber schlecht standardisierbar und für die Routinediagnostik zu arbeitsaufwendig. Zur Validierung anderer Testverfahren ist der Verozellzytotoxizitätstest jedoch das Mittel der Wahl.

Zum immunologischen Nachweis von Shigatoxinen stehen kommerziell erhältliche ELISA-Testkits zur Verfügung. Sie sind weniger sensitiv und spezifisch als der Verozellzytotoxizitätstest, aber wegen ihrer Benutzerfreundlichkeit gut für die Routinediagnostik geeignet.

Die Shigatoxingene und andere wichtige Virulenzgene können mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden (KARCH u. MEYER, 1989a; POLLARD et al., 1990; PIERARD et al., 1998). Die PCR ist sehr sensitiv, was jedoch durch die Reaktionsbedingungen und die Art des Probenmaterials negativ beeinflusst werden kann. Für die Routinediagnostik ist die PCR gut geeignet, da große Probenzahlen mit relativ wenig Arbeitsaufwand untersucht werden können.

Der EHEC-Hämolysinagar zum Nachweis von EHEC-Hämolysin ist als Screeningtest nicht mehr geeignet, da mittlerweile ca. 25% der EHEC keine EHEC-Hämolyse mehr zeigen (BOCKEMÜHL et al., 1997).

Zur Erregerisolierung im Anschluß an die Screeningtests können der Kolonien-Immunoblot oder die Kolonienblot-Hybridisierung eingesetzt werden, wobei beide Techniken auch ohne vorheriges Screening Anwendung finden (KARCH et al., 1986; KARCH und MEYER, 1989b; HULL et al., 1993).

Da bei HUS-Patienten die Erregerausscheidung im Stuhl oft bereits sistiert, ist hier die zusätzliche Untersuchung von Patientenserum auf gegen Lipopolysaccharide der EHEC gebildet IgM-Antikörper sinnvoll (BOCKEMÜHL et al., 1997, MACKENZIE et al., 1998).

2.2.4.3 Epidemiologie

EHEC sind weltweit verbreitet und endemisch. Der bis heute größte EHEC-Ausbruch mit mehr als 8000 infizierten Personen ist im Jahre 1996 in Japan aufgetreten. Hauptsächlich betroffen waren Schulkinder. 106 Kinder erkrankten am hämolytisch-urämische Syndrom, das in drei Fällen letal verlief. Höchstwahrscheinlich wurden die EHEC durch Rettichsprossen im Schulessen übertragen (MICHINO et al., 1998; WATANABE et al., 1996) Im Winter 1992/93 kam es zu dem bisher größten *E. coli* O157:H7 - Ausbruch in Nordamerika. In den Bundesstaaten Washington, Idaho, Nevada und Californien waren insgesamt 732 Personen betroffen. 55 Patienten, vor allem Kinder, erkrankten am hämolytisch-urämische Syndrom. Vier Kinder starben. Als Überträger der Infektion wurden die Hamburger einer Fast-Food-Kette identi-

ziert (BELL et al., 1994). Der bislang größte Ausbruch von *E. coli* O157:H7 in Europa fand in Schottland im Jahre 1996 statt. Hier erkrankten nach dem Verzehr von Fleisch aus einer einzigen Metzgerei 501 Personen, von denen schließlich 20 verstarben (AHMED u. DONAGHY, 1998; COWDEN u. CHRISTIE, 1997; LIDDELL, 1997).

Eine EHEC-Infektion kann bereits durch die orale Aufnahme von nur 10-100 Keimen verursacht werden. Ein möglicher Grund für diese extrem niedrige Infektionsdosis ist die hohe Säuretoleranz dieser Keime. Manche EHEC-Stämme tolerieren pH 2,5 über 5 Stunden, so daß die Magenpassage keine effektive Barriere darstellt (BOCKEMÜHLE u. KARCH, 1996; BENJAMIN et al., 1995).

Aus Untersuchungen der hauptsächlich durch *E. coli* O157:H7 verursachten EHEC-Ausbrüche lassen sich drei wesentliche Übertragungswege ableiten, die 1. auf Nahrungsmittel, Trink- und Badewasser, 2. auf Mensch/Mensch-Kontakte und 3. auf Tier/Mensch-Kontakte zurückgeführt werden können.

Enterohämorrhagische *E. coli* gelangen auf unterschiedlichste Art und Weise in die Nahrungskette des Menschen. Vor allem beim Schlachtprozeß oder bei der Fleischverarbeitung kann Fleisch durch Rinderfäkalien mit EHEC kontaminiert werden (ARMSTRONG et al., 1996). Rinderfäkalien sind ebenfalls eine Kontaminationsquelle für Milchprodukte (ANONYMOUS, 1996). Aus diesem Grund ist der Verzehr von rohen oder unzureichend erhitzten Nahrungsmitteln, v. a. von Rinderhackfleisch, Hamburgern oder unpasteurisierter Milch, als Hauptursache für Infektionen mit *E. coli* O157:H7 anzusehen.

Daneben können auch Obst- und Gemüsearten, die beim Anbau oder während der Verarbeitung mit Kuhdung in Berührung gekommen sind, als Überträger für *E. coli* O157:H7 fungieren. Beispiele hierfür sind Kopfsalat (ACKERS et al., 1998), Kartoffeln (MORGAN et al., 1988), Rettichsprossen (WATANABE u. OZASA, 1997), sowie unpasteurisierter Apfelsaft und Apfel-Cidre (BESSER et al., 1993; CDC, 1996).

Mehrere Autoren haben *E. coli* O157:H7 - Ausbrüche mit dem Konsum von fäkal verunreinigtem Trinkwasser in Zusammenhang gebracht (JONES u. ROWORTH, 1996; SWERDLOW et al., 1992). Aber auch das Wasser in Badeseen kann den Er-

reger enthalten und so die Ursache für Infektionen mit *E. coli* O157:H7 sein (BREWSTER et al., 1994; KEENE et al., 1994). Es hat sich gezeigt, daß gerade diese Serogruppe im Trink- und Badewasser v. a. bei niedrigeren Temperaturen viele Wochen überleben kann. Es konnte nachgewiesen werden, daß *E. coli* O157:H7 nach zwölfwöchiger Persistenz im Wasser zwar noch lebensfähig, aber mit herkömmlichen Methoden nicht mehr anzüchtbar ist (WANG u. DOYLE, 1998).

Da nur sehr wenige Keime für eine Infektion mit *E. coli* O157:H7 ausreichen, findet die Übertragung von Mensch zu Mensch besonders leicht bei mangelnder Hygiene und engen zwischenmenschlichen Kontakten statt. Aus epidemiologischen Erhebungen läßt sich ableiten, daß der Erreger vornehmlich in Kindertagesstätten und sozial-caritativen Einrichtungen übertragen wird (BELONGIA et al., 1993; PAVIA et al., 1990). Bei einigen Ausbrüchen, die auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen waren, konnten in der Folge auch Mensch-zu-Mensch-Übertragungen nachgewiesen werden (GRIFFIN et al., 1991). Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß man diesen Übertragungsweg auch für die Infektionsausbreitung in Familien und Krankenhäusern verantwortlich macht (LUDWIG et al., 1997; KARMALI et al., 1988).

Einige der dokumentierten Fälle von *E. coli* O157:H7-Infektionen lassen sich auf den Besuch von Bauernhöfen und damit auf den Kontakt mit kontaminierten Tierbeständen zurückführen (RENEWICK et al., 1993; SHUKLA et al., 1995).

Das wichtigste Erregerreservoir von *E. coli* O157:H7 und anderer EHEC sind landwirtschaftlich genutzte Rinder, bei denen die Infektion in der Regel asymptomatisch verläuft. (KARMALI 1989; ORSKOV et al., 1987; WELLS et al., 1991). STEC können in über 50% der Kotproben von Rindern nachgewiesen werden. Etwa 70% der isolierten Stämme haben alle Virulenzmerkmale der EHEC (RICHTER et al., 1997, WIELER et al., 1996).

Die Zusammensetzung des Futters hat wesentlich Einfluß auf die EHEC-Ausscheidungsrate. Bei Rindern, die überwiegend mit Heu, d. h. energiearm und rohfaserreich gefüttert werden ist der Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren im Verdauungskanal niedrig. Der daraus resultierende neutrale bis basische pH-Wert begünstigt das Wachstum von EHEC, so daß sich die Ausscheidungsrate erhöht (KUDVA

et al., 1997). Bei energiereicher Fütterung z.B. mit Getreide sinkt der pH- Wert in den sauren Bereich, was zu einer Absenkung der EHEC- Ausscheidungsrate führt. Es gibt aber auch Studien, die eine erhöhte EHEC- Ausscheidung bei energiereicher Fütterung beschreiben. (DIEZ-GONZALEZ et al., 1998). Entscheidend ist aber letztlich nicht die Gesamtzahl ausgeschiedener EHEC, sondern die Ausscheidungsrate säureresistenter Keime. Wie alle *E. coli* besitzen EHEC Resistenzmechanismen, um sich gegen hohe Protonenkonzentrationen in ihrer Umgebung zu schützen. Diese Resistenzmechanismen werden durch das moderat saure Pansenmilieu energiereich gefütterter Rinder aktiviert und ermöglichen den EHEC die Säurebarriere des Magens beim Menschen zu überwinden (LIN et al., 1996).

Neben Rindern konnten *E. coli* O157:H7 aus Schafen, Ziegen, Pferden, Hunden, Hirschen und Seemöwen isoliert werden (BEUTIN et al., 1993; TREVENA et al., 1996; KEENE et al., 1997; WALLACE et al., 1997). Die häufigsten Ausscheider von Nicht-O157 EHEC-Stämmen sind Schafe und Ziegen. Mit geringerer Häufigkeit wurden diese Stämme auch in Schweinen, Hunden und Katzen gefunden (BEUTIN et al., 1993). Bei den meisten dieser aus Tieren isolierten Nicht-O157 EHEC-Stämme fehlte jedoch das *eae*-Gen, das für die volle pathogenetische Bedeutung beim Menschen verantwortlich ist (BEUTIN et al., 1995). Obwohl diese Stämme demzufolge eine geringere Virulenz aufweisen, sind sie in Deutschland für 34,5% der durch EHEC verursachten Enteritidfälle und für 4,3 % der HUS-Erkrankungen verantwortlich (BOCKEMÜHL et al., 1997).

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial und Versuchsaufbau

Untersucht und ausgewertet wurden 372 Hundekotproben, die von Oktober 1996 bis August 1998 gesammelt worden waren. Die Hunde wurden nach klinischem Gesundheitszustand und Lebensalter in folgende vier Gruppen eingeteilt:

1. G1: klinisch gesunde Hunde \leq 6 Monate (n = 57)
2. G2: klinisch gesunde Hunde $>$ 6 Monate (n = 52)
3. K1: durchfallkranke Hunde \leq 6 Monate (n = 112)
4. K2: durchfallkranke Hunde $>$ 6 Monate (n = 151)

Das Untersuchungsmaterial von durchfallkranken Hunden stammt aus der Routinediagnostik der Firma Laboklin, Bad Kissingen. Auswahlkriterien waren mehr als zwei Kotentleerungen in 24 Stunden und der Absatz von ungeformtem Faeces. Die Kotproben von Hunden ohne Durchfall stammen aus dem Patientenkontext der Tierarztpraxis Dr. U. Heusinger und der Praxis für Naturheilverfahren D. Shineflew, Bad Neustadt.

Mittels Fragebogen (siehe S.4), der vom Patientenbesitzer auszufüllen war, wurden bei gesunden Hunden folgende Anamnesedaten erhoben:

- Datum der Probennahme
- Rasse
- Alter
- Geschlecht
- Fütterung (Dosenfutter, Trockenfutter, Küchenreste, rohes Fleisch)

Bei Hunden mit Durchfall wurden die entsprechenden Anamnesedaten dem mit der Probe an das Labor eingesandten Untersuchungsantrag (siehe S. 5) entnommen. Darüber hinaus wurden folgende Daten erfaßt:

- Durchfall blutig / schleimig
- Zahl der täglichen Kotentleerungen
- Körpergewichtsverlust
- Flatulenz
- Meteorismus
- Krankheitsverlauf
- antibiotische / chemotherapeutische Prämedikation

Die Kotproben wurden zunächst nach klassischen Methoden parasitologisch und mikrobiologisch untersucht, wobei fehlendes, oder nur geringgradiges Wachstum von *E. coli* (weniger als 15 Kolonien) zum Probenausschluß führte. Aussortierte Proben blieben in der Ergebnisauswertung unberücksichtigt.

Bei den übrigen Proben wurde die kultivierte Enterobacteriaceenflora mit der Polymerase-Kettenreaktion auf verschiedene Virulenzgene von enterohämorrhagischen, enteroaggregativen und enteroinvasiven *E. coli* (EHEC, EIEC und EAEC) untersucht. Zum Nachweis von Shigatoxinen wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA eingesetzt. Die Isolierung virulenzgentragender Keime erfolgte mittels Kolonienblot-Hybridisierung.

Material und Methoden

Fragebogen zur Erhebung der Anamnesedaten bei gesunden Hunden:

UNTERSUCHUNGSANTRAG

Labornummer:

Probeneingang:

keine Laborkosten berechnen

tierärztliche Praxis:

Patientenbesitzer:

Name:

Str.:

Wohnort:

Tel.:

Datum der Probennahme: _____

Angaben zum Hund:

Rasse: _____ Alter: _____

Geschlecht: _____ letzte Impfung: _____

Entwurmung: regelmäßig ja nein

Wie oft entwurmen Sie? : _____

Welches Präparat verwenden Sie? : _____

Fütterung: (bitte ankreuzen)

Dosenfutter

Trockenfutter

Küchenreste

rohes Fleisch

Untersuchungsantrag für durchfallkranke Hunde:

Vorbericht zur Stuhluntersuchung bei Verdauungsstörungen und Diarrhoe

Für die Befundbesprechung bei Faeces-Untersuchungen wird um nachstehende Angaben gebeten:

- Diarrhoe:** ja Blutbeimengungen Schleim enthaltend unabhängig/abhängig von der Nahrungsaufnahme
 nach Trinken aus Pfützen, z.B. auf Spaziergängen
- Obstipation:** ja wechselnd nein
- Gewichtsabnahme:** ja nein
- Flatulenz:** ja nein
- Meteorismus:** ja nein
- Erbrechen:** nüchtern nach der Nahrungsaufnahme mehrere Stunden nach der Nahrungsaufnahme
 unabhängig von der Nahrungsaufnahme
- Zahl der täglichen Kotentleerungen:**
- Fell:** glänzend und gut pigmentiert staubig/trocken
- Haut:** - Neigung zu Ekzembildung oder zu Dermatitiden
- Klinische Anmerkungen und bisherige Therapie:.....

3.2 Parasitologische Untersuchung

Verwendet wurde das Anreicherungssystem der Firma Bio Répair, Waibstadt. Dieses Anreicherungssystem beruht auf dem sog. M.I.F.C. - Verfahren (Merthiolate-Iodine-Formaldehyde-Concentration), mit dem sowohl sämtliche Protozoenstadien wie auch alle beim Hund relevanten Wurmeier nachgewiesen werden können:

Material:

- Probenröhrchen (Art.-Nr. BR 102)
- Filterröhrchen (Art.-Nr. BR 103)
- Medium A (Art.-Nr. BR 111): 530 ml Aqua dest.
 - + 400 ml Thimerosal (1:1000 verdünnt in aqua dest.)
 - + 60 ml Konz. Formalin (40 %)
 - + 10 ml Glycerin
- Medium B (Art.-Nr. BR 112): Ethylacetat
- Medium C (Art.-Nr. BR 113): Lugol

Durchführung:

Ein im Kit enthaltener Stempel dient zur Suspendierung einer definierten Kotprobenmenge in 3,3 ml Medium A.

Nach Zugabe von 1,25 ml Medium B, gründlichem Mischen und Filtern zur Entfernung grober Partikel erfolgt eine zweiminütige Sedimentation. Anschließend wird zur Phasentrennung 5-10 Min. bei 1500 - 2000 g zentrifugiert.

Wenige Tropfen des Sediments werden auf zwei Objektträger überführt und durch Zugabe von Medium C angefärbt.

Zur Identifizierung von Larvenstadien und Wurmeiern erfolgt die mikroskopische Betrachtung des fertigen Präparats mit 100-facher und zur Identifizierung von Protozoen mit 400 - 1000 facher Vergrößerung.

3.3 Mikrobiologische Untersuchung

Folgende Nährmedien wurden beimpft und falls nicht anders beschrieben für 24h bei 36°C inkubiert:

zum Nachweis gramnegativer Keime:

- MacConkey II-Agar (Art.-Nr. 4354078; Becton Dickinson, Heidelberg) und
- Hektoen-Enterobacteriaceae-Agar (Art.-Nr. 4354075; Becton Dickinson, Heidelberg).

zur Differenzierung hämolysierender E. coli:

- Columbia-Agar mit 5% Schafblut (Art.-Nr. 43049; bioMérieux, Nürtingen)

zum Nachweis von Salmonellen:

- XLD-Agar (Art.-Nr. 4354090; Becton Dickinson, Heidelberg) und
- SMID-Agar (Art.-Nr. 43299; bioMérieux, Nürtingen)

wobei die Salmonellen vor der Beimpfung jeweils sowohl in Tetrathionate Broth Base (Art.-Nr. DM 219; Mast Diagnostica, Reinfeld), 46 g/l + 20 ml Jodlösung als auch in Selenite F-Broth (Art.-Nr. DM 210; Mast Diagnostica, Reinfeld), 12,8 g/l über 24h angereichert wurden.

zum Nachweis von Yersinien:

- Yersinien-Agar (Art.-Nr.43209; bioMérieux, Nürtingen)

Die Inkubation erfolgte hier für 48h bei Zimmertemperatur. Zur Kälteanreicherung der Yersinien wurde in gepuffertem Peptonwasser (Art.-Nr. DM 494; Mast Diagnostica, Reinfeld), 20g/l Aqua dest., suspendierter Kot (1g Kot in 9-ml gepuffertem Peptonwasser) im Kühlschrank aufbewahrt und drei Wochen lang einmal wöchentlich auf Yersinien-Agar ausgestrichen und jeweils 48h bei Zimmertemperatur bebrütet.

Material und Methoden

Die Differenzierung der Enterobacteriaceen erfolgte mittels API-Identifizierungssystem 32E (Art.-Nr. 32400; bioMérieux, Nürtingen).

Für die Gruppenzuordnung der Salmonellen nach dem Kauffmann - White - Schema wurden folgende Salmonellen-Testseren der Firma SIFIN, Berlin verwendet:

Polyspezifische Testseren:

- polyspezifisches Testreagens I (A-E); Zulassungsnr. 183a/97
- polyspezifisches Testserum II (F-G7); Zulassungsnr. 295a/91

Monospezifische Testseren:

- Enteroclon Anti-Salmonella Gruppe B (O4, O5, O27); Zulassungsnr. 70a/97
- Enteroclon Anti-Salmonella Gruppe C (O7, O8); Zulassungsnr. 71a/97
- Gruppenspezifisches Testserum Anti-Salmonella D (O9, O46, Vi); Zulassungsnr. 301a/91
- Gruppenspezifisches Testserum Anti-Salmonella E (O3, O10, O15, O19, O34); Zulassungsnr. 301a/91

3.4 DNA-Analyse mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine exponentielle Amplifikation von DNA-Fragmenten, die durch zwei synthetische Oligonukleotid-Primer spezifisch definiert werden können.

Durch wiederholtes Denaturieren der DNA-Matrize, Annealen der Primer und Synthese des Gegenstrangs, was zusammen als ein Zyklus bezeichnet wird, ist es möglich, die definierten DNA-Fragmente in einer Kettenreaktion innerhalb kurzer Zeit millionenfach zu vermehren. Die so vermehrten Zielsequenzen können anschließend durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden (MULLIS 1990).

3.4.1 Gewinnung und Reinigung bakterieller DNA

Die Keime wurden zunächst kultiviert und anschließend lysiert. Für die Untersuchung auf die Zielsequenz *invas* des Invasionsplasmids *pINV* der EIEC war eine Reinigung des Lysats notwendig. Für die Zielsequenzen *hlyA*, *stx₁B*, *stx₂B*, *stx₂cB*, *stx₂A*, *stx₂cA*, *stx₂dA*, *stx₂eA* und *eae* der EHEC sowie die Sequenz *eagg* des Virulenzplasmids *pCVD₄₃₂* der EAEC konnte auf eine Reinigung verzichtet werden.

Die Kultivierung erfolgte auf MacConkey II - Agar (Art.-Nr. 4354078; Becton Dickinson, Heidelberg) für 24 h bei 36°C. Alle gewachsenen Kolonien wurden in 1 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung suspendiert und zur Lyse der Bakterien 1:25 mit Wasser für die HPLC (Art.-Nr. 27,073-3; Sigma-Aldrich, Steinheim) verdünnt, 480 µl Wasser für die HPLC + 20 µl Bakteriensuspension. Die verbliebenen 980 µl der Bakteriensuspension wurden mit Glycerin (Art.-Nr. 3783.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) 1:1 konserviert.

Die Anzüchtung der für die PCR verwendeten Kontrollstämme EDL 933 und 4140 bzw. D434 (siehe Tab. 3.4.3.) verlief in gleicher Weise. Von den gewachsenen Kolonien wurden jedoch nur drei bis fünf mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und direkt in 500 µl Wasser für die HPLC (Art.-Nr. 27,073-3; Sigma-Aldrich, Steinheim) suspendiert. Die Aufbewahrung der Bakterienlysate und Glycerinkonserven erfolgte bei -20° C.

Zur Reinigung der DNA aus Bakterienlysate für den Nachweis von *invas* wurde der QIAamp Blood Kit (Art.-Nr. 29108; Qiagen GmbH, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet:

Die Bakteriensuspension wird mit 25 µl Qiagen-Protease und 200 µl AL-Puffer gründlich vermischt und anschließend für 10 Min. bei 70° C inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl Ethanol wird der Ansatz auf eine Säule mit Silicamembran pipettiert und 1 Min. mit 8000 upm zentrifugiert.

Material und Methoden

Die Reinigung der an die Silicamembran reversibel gebundenen DNA erfolgt durch zweimaliges Waschen mit AW-Puffer und jeweils anschließendem Zentrifugieren. Zum Eluieren der DNA wird die Säule mit 200 µl vorgewärmtem AE-Puffer für 5 Minuten bei 70° C inkubiert und anschließend 1 Min. mit 8000 upm abzentrifugiert.

3.4.2 PCR-Ansatz

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50 µl, bestehend aus folgenden Komponenten:

- 24 µl Wasser für die HPLC (Art.-Nr. 27,073-3; Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 5 µl AmpliTaq-Reaktionspuffer 10-fach (Art.-Nr. N 808-0245; Perkin Elmer, Weiterstadt)
- 3 µl MgCl₂-Puffer (Art.-Nr. N 808-0245; Perkin Elmer, Weiterstadt)
- je 1 µl Primer 1 (30 µM) und Primer 2 (30 µM) (Sequenz und Bezeichnung siehe Tab. 3.5.4; Hergestellt von Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP),

Ultrapure d NTP Set 2'-Desoxynucleoside 5'-Triphosphate Minimal Diphosphate (Art.-Nr. 27-2035-02; Pharmacia Biotech, 79111 Freiburg)

- 0,4 µl Polymerase (5 Units / µl)

Um das Auftreten unspezifischer Elektrophoresebanden zu vermeiden, wurde für die Zielsequenz *eagg* des Plasmids *pCVD₄₃₂* Ampli Taq Gold Polymerase 250 U, 5 U/µl (Art.-Nr. N 808-0245; Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet. Für die anderen Zielsequenzen wurde Ampli Taq DNA Polymerase 250 U, 5 U/µl (Art.-Nr. N 808-0070; Perkin Elmer, Weiterstadt) benutzt.

- 15 µl verdünnte Bakteriensuspension oder gereinigte DNA (5 µl Bakteriensuspension oder gereinigte DNA + 10 µl Wasser für die HPLC bei Kontrollstämmen)

Die PCR-Bedingungen sind in Tab. 3.4.3 beschrieben. Die Nukleotidsequenzen der Primerpaare HlyA1/HlyA4, KS7/KS8, GK3/GK4, LP43/LP44, SK1/SK2 und Eagg1/Eagg2 wurden veröffentlicht von SCHMIDT et al., 1995; *Infect Immun* 63:1055-61, SCHMIDT et al., 1994; *Zbl Bakteriologie* 251:201-23, GUNZER et al., 1992; *J. Clin. Microbiol.* 30:1807-10, COBULA et al., 1995; *J. Clin. Microbiol.* 33:248-50, SCHMIDT et al., 1994; *Zbl. Bakteriologie* 281:201-13 bzw. SCHMIDT et al., 1995; *J. Clin. Microbiol.* 33:701-5. Die Kontrollstämme EDL 933 und 4140 wurden uns von Herrn Prof. H. Karch, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Sequenz des Primerpaars Invas F3 / Invas B1 und den Kontrollstamm D434 erhielten wir von Herrn Prof. R. M. Batt, Department of Medicine, Royal Veterinary College, North Mymms, Hertfordshire.

3.4.3 PCR-Bedingungen, Nukleotidsequenz der Primer, Kontrollstämme

Primer	Primer-Sequenz	Ziel-Sequenz	PCR-Bedingungen			Länge des PCR-Produkts	Kontrollstamm
			Denaturierung	Annealing	Extension		
HIYA1 HIYa4	5'-ggt gca gca gaa aaa gtt gtag-3' 5'-tct cgc ctg ata gtg ttt ggt a-3'	E-hlyA	94°C, 30s	57°C, 60s	72°, 90s	1550 bp	EDL 933
HS7 KS8	5'-ccc gga tcc atg aaa aca tta tta ata gc-3' 3' 5'-ccc gaa ttc agc tat tct gag tca acg-3'	stx1B	94°C, 30s	52°C, 60s	72°, 40s	285 bp	EDL 933
GK3 GK4	5'-atg aag aag atg ttt atg-3' 5'-tca gtc att att aaa ctg-3'	stx2B stx2cB	94°C, 30s	52°C, 60s	72°, 40s	260 bp	EDL 933
LP43 LP44	5'-atc cta ttc ccg gga gtt tac g-3' 5'-gcg tca tog tat aca cag gag c-3'	stx2A stx2cA stx2dA stx2eA	94°C, 30s	57°C, 60s	72°, 90s	584 bp	EDL 933
SK1 SK2	5'-ccc gaa ttc ggc aca agc ata agc-3' 5'-ccc gga tcc gtc tcg cca gta ttc g-3'	eaeA	94°C, 30s	52°C, 60s	72°, 60s	863 bp	EDL 933
Eagg1 Eagg2	5'-ctg gcg aaa gac tgt atc at-3' 5'-caa tgt ata gaa atc cgc tgt t-3'	eagg	94°C, 30s	53°C, 60s	72°, 60s	630 bp	4140
Invas_F3 Invas_B1	5'-tgg aaa aac tca gtg cct ctg cgg-3' 5'-ttc tga tgc ctg atg gac cag gag-3'	Invas	* 94°C, 30s	58°C, 30s	72°, 30s	140 bp	D434

* Vorprogramm: 95°C 30s, 72°C 60s, 5 Zyklen

3.4.4 Gelelektrophorese

Herstellung der Agarose- und der Visigele:

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels wurden 450 mg Agarose zur DNA/RNA-Elektrophorese (Art.-Nr. 6352.2; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) in 30 ml 10x TBE Puffer (Art.-Nr. 3061.1; Carl Roth GmbH+Co., 76185 Karlsruhe) 1:10 verdünnt gelöst, zweimal aufgekocht und anschließend mit 3 µl Ethidiumbromidlösung 1% (Art.-Nr. 2218.1; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) versetzt.

Zur Herstellung eines ca. 3,5 %igen Visigels wurden 3 ml Visi Gel™ Separation Matrix (Art.-Nr. 400750; Stratagene, Heidelberg) mit 50 ml TAE-Puffer (10x) (Art.-Nr. 16-0111Y; Bio Whittaker, Boehringer Ingelheim, Heidelberg) 1:10 verdünnt gemischt und zweimal aufgekocht. Um Blasenfreiheit zu erreichen, war es notwendig, die entstandene zähflüssige Lösung 10-20 Min. im Wasserbad bei 60°C zu inkubieren. Anschließend wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung 1% (Art.-Nr. 2218.1; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) zugegeben.

Nach gründlichem Mischen konnten die Gele in die Gießstation gegossen und mit Kämmen versehen werden. Nach dem Aushärten wurden die Kämmen vorsichtig entfernt und die fertigen Gele in die Elektrophoresekammern verbracht. Die Visigele wurde mit TAE- und die Agarosegele mit TBE-Puffer jeweils einfach-konzentriert überschichtet.

Elektrophoresebedingungen und Auswertung:

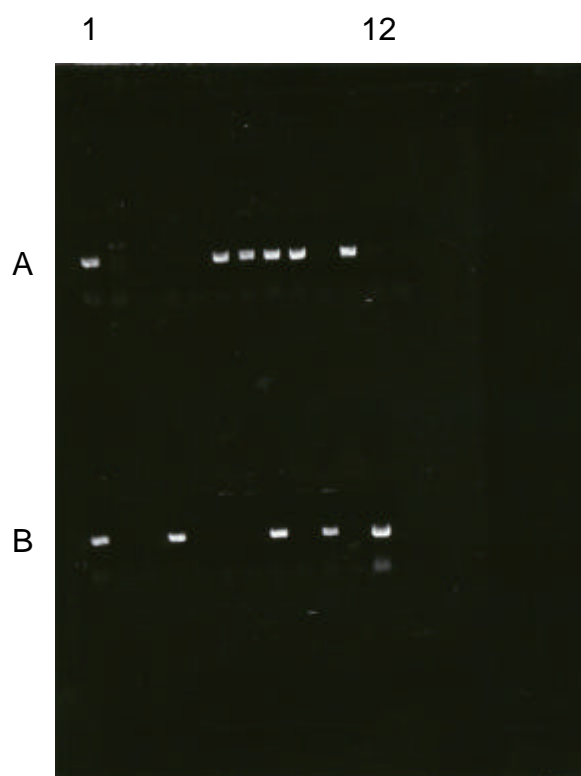
Je 7,5 µl PCR-Produkt vom jeweiligen Kontrollstamm und von den zu analysierenden Proben wurden mit 2,5 µl Gel-Ladepuffer bestehend aus 125 mg Xylencyanol (A 513.1; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) + 125 mg Bromphenolblau Na-Salz (A 512.1; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) + 15 ml Glycerin (Art.-Nr. 3783.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) + 35 ml Wasser für die HPLC (Art.-Nr. 27,073-3; Sigma-Aldrich, Steinheim) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Bei einer angelegten Spannung von 80V betrug die Laufzeit in Abhängigkeit von der Länge des DNA-Fragments und der Konzentration des verwendeten Gels 15-30 Minuten. Im An

Material und Methoden

schluß an die Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert (siehe Abb. 3.4.3).

Proben galten dann als positiv, wenn sie eine Bande aufwiesen, deren Laufweite mit der Laufweite der entsprechenden Kontrollstammbande (siehe Tab. 3.4.3.) übereinstimmte.

Abbildung 3.4.4.: Elektrophoresegel



Aufgetragen wurden je 7,5 µl PCR – Produkt aus einer PCR-Reaktion zur Amplifizierung des 863 bp großen *eae* – Gens.

Spur 1: Kontrollstamm EDL 933, Spur 2-12: untersuchte Proben,

Reihe A: positiv sind Probe 6-9 und 11, Reihe B: positiv sind Probe 4, 8, 10 und 12

3.5 Shigatoxin - Test

Verwendet wurde der Premier EHEC (Art.-Nr. 608096V; HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Der Premier EHEC ist ein in vitro Mikrotiter-Enzym-Immunoassay (EIA) zum Nachweis von Stx1 und Stx2.

Die Voranreicherung der Keimflora erfolgte in modifizierter tryptischer Sojabouillon (m-TSB), das darin enthaltenes Mitomycin C induziert die Shigatoxinbildung.

3.5.1 Anreicherung in modifizierte tryptische Sojabouillon (m-TSB):

Herstellung des Anreicherungsmediums modifizierte tryptische Sojabouillon (m-TSB):

Zusammensetzung:

30 g Tryptic Soy Broth (Art.-Nr. 14980-031; Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein)

1,5 g Bile Salts No 3 (Art.-Nr. L56; Oxoid, Wesel)

1,5 g di-Kaliumhydrogenphosphat (Art.-Nr. 6875.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)

1000 ml entmineralisiertes Wasser

Die Bestandteile des Mediums wurden in der angegebenen Menge Wasser suspendiert, kurz aufgekocht und 15 min bei 121° C sterilisiert. (geforderter pH-Wert des Mediums bei 25° C: 7,3 +/- 0,2). Unmittelbar vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 250 µl Mitomycinlösung, 0,2 mg Mitomycin C (Art.-Nr. 4150.1; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) / 1 ml entmineralisiertem Wasser steril filtriert pro 1l m-TSB-Medium. Das fertige Nährmedium wurde zu 4 ml in 100 ml-Kulturröhrchen unter sterilen Bedingungen portioniert und am Tag der Herstellung verwendet.

Beimpfen des Anreicherungsmediums und Kulturbedingungen:

Von den bei -20°C aufbewahrten Kotproben wurde mit einem sterilen Tupfer jeweils eine geringe Menge Kot entnommen und in 2 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung suspendiert. 50 µl dieser Suspension wurden in die m-TSB-Kulturröhrchen überführt und über Nacht (12-18 Stunden) bei 36°C geschüttelt.

In einem zweiten Versuchsansatz erfolgte die Beimpfung des m-TSB-Nährmediums mit 50 µl der in Glycerin konservierten Keimabschwemmungen (siehe Kap. 3.4.1), wobei hier nur 9 Proben untersucht wurden, bei denen mittels PCR Shigatoxingene nachgewiesen worden waren.

3.5.2 EIA

Nach Sedimentation der Kultur wurden 50 µl Kulturüberstand in 200 µl Probenverdünner suspendiert.

Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden jeweils mit 100µl der verdünnten Proben beschickt, die Kavitäten für die Positiv- und die Negativkontrolle mit je 2 Tropfen der entsprechenden im Kit enthaltenen Kontrollen.

Die Mikrotiterplatte wurde 30 Sekunden geschüttelt, mit Folie abgedeckt eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 8 mal mit Waschpuffer gewaschen.

In drei weiteren Schritten wurden nacheinander je 2 Tropfen Detection Antibody, Enzym-Konjugat und Substratlösung zugegeben, wobei die Mikrotiterplatte zwischen den einzelnen Schritten jeweils wie oben geschüttelt, 30 Min. inkubiert und gewaschen wurde.

Im Anschluß an die Substratzugabe erfolgte die Unterbrechung der Farbreaktion nach 10 minütiger Inkubation durch Zugabe von je zwei Tropfen Stopplösung.

Die visuelle Auswertung erfolgte innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung, die photometrische Auswertung innerhalb von 30 Minuten bichromatisch bei 450 / 650 nm. Die Reaktion galt als positiv, wenn eine eindeutige Gelbfä-

bung zu sehen war bzw. bei einem OD-Wert $\geq 0,180$. Die Reaktion galt als negativ, wenn die Lösung farblos blieb, bzw. der OD-Wert unter 0,180 lag.

3.6 Kolonienblot-Hybridisierung

Die Kolonienblot-Hybridisierung wurde zur Isolierung der *stx*- und *eagg*- positiven *E. coli*-Stämme verwendet.

Ausgangsmaterial der Analyse sind auf Nähragarplatten angezüchtete Bakterienkolonien, von denen Zellmaterial durch Auflegen einer Nylonmembran auf diese übertragen wird. Die bakterielle DNA wird denaturiert und auf der Nylonmembran fixiert. Anschließend werden die gesuchten DNA-Fragmente mit einer Digoxigenin-11-dUTP- markierten Sonde aus komplementärer einsträngiger DNA hybridisiert und durch eine Enzym-Farbreaktion sichtbar gemacht. Durch vergleichende Betrachtung der Nylonmembran mit der Nähragarplatte können positive Kolonien identifiziert werden.

3.6.1 PCR zur DNA-Sondenmarkierung mit Digoxigenin-11-dUTP

DNA-Sonden sind zu den Zielgenen komplementäre DNA-Fragmente. Als Matrizen-DNA diente hier gereinigtes PCR-Produkt, das mit den Primern LP43/LP44, KS7/KS8, GK3/GK4 und Eagg1/Eagg2 reamplifiziert wurde (PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.4.3.). Zum Markieren der Sonden wurde dTTP im PCR-Ansatz zum Teil durch Digoxigenin-11-dUTP ersetzt.

Material und Methoden

Reinigung des PCR-Produkts:

Verwendet wurde der QIAquick PCR Purification Kit (250) der Firma Qiagen GmbH, Hilden (Art.-Nr. 28106) nach Anleitung des Herstellers:

50 µl PCR - Produkt werden mit 250 µl PB - Puffer vermischt und auf eine Säule mit Silicamembran aufgetragen. Nach dem Abzentrifugieren wird die an die Silicamembran gebundenen DNA mit 750 µl PE - Puffer gewaschen und anschließend mit 40 µl Elutionspuffer eluiert.

PCR-Ansatz:

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50 µl, bestehend aus folgenden Komponenten:

34,5 µl Wasser für die HPLC (Art.-Nr. 27,073-3; Sigma-Aldrich, Steinheim)

5 µl AmpliTaq-Reaktionspuffer 10-fach (Art.-Nr. N 808-0245; Perkin Elmer, Weiterstadt)

3 µl MgCl₂-Puffer (Art.-Nr. N 808-0245; Perkin Elmer, Weiterstadt)

1 µl Primer 1 (30 µM), (Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)

1 µl Primer 2 (30 µM)

1 µl dNTP-Mix (10 mM dATP, 10mM dGTP, 10mM dCTP, 7mM dTTP)

Ultrapure d NTP Set 2'-Desoxynucleoside 5'-Triphosphate Minimal Diphosphate (Art.-Nr. 27-2035-02; Pharmacia Biotech, 79111 Freiburg)

3,5 µl Digoxigenin-11-dUTP (1mM) (Art.-Nr. 1093088; Roche, Mannheim)

2,5 µl Ampli Taq DNA Polymerase 250 U, 5 U/µl (Art.-Nr. N 808-0070; Perkin Elmer, Weiterstadt)

4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (ca. 0,25 µg) als Matrizen-DNA

Im Anschluß an die PCR wurden 5 µl des Reaktionsansatzes zur Kontrolle auf ein Agarosegel (Herstellung siehe Kap. 3.4.4) aufgetragen.

3.6.2 Hybridisierungsreaktion:

Puffer und Lösungen:

Denaturierungslösung:

0,5 N NaOH (Art.-Nr. KO21.1. 1N; Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)

1,5 M NaCl (Art.-Nr. 9265.1.; Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe)

Neutralisierungslösung:

1M Tris-HCl pH 7,5 (Art.-Nr. 6331.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)

1,5 M NaOH

SSC-Puffer 20-fach:

175,3 g/l NaCl

88,3 g/l Na-Citrat (Art.-Nr. 4088.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)

pH 7,4

Hybridisierungslösung:

5-fach SSC-Puffer

0,1 % N-Lauroylsarcosin (Art.-Nr. L5125, Sigma, Steinheim)

0,02 % SDS (Natriumdodecylsulfat, Art.-Nr. 2326.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)

zur frisch angesetzten Lösung Zugabe von 1 % (w/v) Blocking Reagents (Dig DNA Labeling and Detection Kit, Art.-Nr. 1093657 Boehringer) und Inkubation für 1 h bei 70° C unter ständigem Rühren

Puffer 1:

100 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

Puffer 2:

0,5 % Blocking Reagents (Dig DNA Labeling and Detection Kit, Art.-Nr. 1093657 Boehringer) für 1 h bei 70° C in Puffer 1 gelöst

Puffer 3:

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

Material und Methoden

50 mM MgCl₂ (Art.-Nr. 5332.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)

pH 9,5

Färbelösung:

45 µl NBT (Dig DNA Labeling and Detection Kit, Art.-Nr. 1093657 Boehringer)

35 µl X-Phosphat (Dig DNA Labeling and Detection Kit, Art.-Nr. 1093657 Boehringer)

10 ml Puffer3

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (Ethylendiamin - tetra - acetat, Art.-Nr. 8040.1.; Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe)

pH 8,0

Kolonie-Transfer auf eine Nylonmembran:

Von allen in der PCR positiven Proben wurde die in Glycerin konservierte Keimabschwemmung auf MacConkey II-Agar ausgestrichen und bei 36°C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden in 1 ml isotonischer NaCl-Lösung abgeschwemmt und in einer Verdünnungsreihe jeweils 1:10 verdünnt. Die Verdünnungsstufen 10⁶ - 10³ wurden erneut auf MacConkey II-Agar bei 36°C über Nacht kultiviert und je Probe zwei mit abgegrenzten Einzelkolonien bewachsene Agarplatten ausgewählt.

Zum Kolonien-Transfer wurde eine Nylonmembran (Roti® - Nylon plus, Art.-Nr. K058.1 Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe) auf die ausgewählten Agarplatten gelegt, deren Position markiert und anschließend wieder abgezogen. Als Positivkontrolle diente eine zusätzlich auf die Nylonmembran aufgeriebene Kolonie des jeweiligen Positivkontrollstammes.

Lyse der Bakterien:

Die Nylonmembran wurde in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit der Kolonie-seite nach oben zunächst für 20 min. auf ein mit Denaturierungslösung, anschließend für 15 min. auf ein mit 0,2% Triton-X100 (Sigma, Steinheim) und 0,5 N NaOH und danach für 5 min. auf ein mit Neutralisierungslösung getränktes Whatman 3 MM Papier (Art.-Nr. F 595, A. Hartenstein Labor + Medizintechnik GmbH, Würzburg) gelegt. Zwischen den einzelnen Schritten und nach dem letzten erfolgte jeweils ein 5 minütiges Trocknen auf einem ungetränktes Whatman 3 MM Papier. Abschließend wurde die Membran für 5 min. in 2-fach SSC gewaschen, trocknen lassen und zur DNA-Fixierung zwischen 2 Whatman 3 MM Papieren bei 80° C für 1 - 2 h gebacken.

Waschen zur Entfernung von Zellresten:

Die Membran wurde nacheinander für 20 min. bei 50° C in 2-fach SSC; 1% SDS, für 10 min. bei Raumtemperatur in 2-fach SSC; 0,1% SDS und abschließend für 10 min. ebenfalls bei Raumtemperatur in 2-fach SSC gewaschen.

Hybridisierung:

Zur Erhöhung der Spezifität wurde die Membran mit 20 ml Hybridisierungslösung / 100 cm² Membranfläche bei 86° für 1 h prähybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60° C mit 2,5 ml Hybridisierungslösung / 100 cm² Membranfläche, der vor der Überschichtung die zur Denaturierung für 10 min. auf 95° C erhitzte und sofort für 5 min. auf Eis abgekühlte Sonde zugesetzt worden war.

Waschen:

Die Membran wurde zunächst 2 mal für jeweils 5 min. bei Raumtemperatur in 2-fach SSC; 0,1% SDS gewaschen. Der spezifische Waschschrift, der Basenpaarungen bei

Material und Methoden

weniger als 95% Homologie zwischen Sonde und DNA verhindert, erfolgte für 2 mal 15 min. bei 60° C mit 0,04-facher SSC; 0,1% SDS.

Färbereaktion:

Die Membran wurde 1 min. in Puffer 1 gewaschen, für 30 min. in 100 ml Puffer 2 bei Raumtemperatur inkubiert, erneut 1 min. in Puffer 1 gewaschen und mit 20 ml Antikörperkonjugat für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten weitere 2 Waschschrte für je 15 min. mit Puffer 1 und eine 2 minütige äquibrierung mit Puffer 3. Zur Färbereaktion wurde die Membran mit 10 ml Färbelösung in eine Plastiktasche eingeschweißt und im Dunkeln bis zum Sichtbarwerden der Banden inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit 50 ml TE-Puffer unterbrochen.

Auswertung:

Zur Auswertung wurde die Nylonmembran mit der bewachsenen MacConkey-II - Agarplatte verglichen. Kolonien galten als positiv, wenn auf der Nylonmembran an der entsprechenden Lokalisation eine Bande zu sehen war.

Pro Probe wurde jeweils eine positive Kolonie ausgewählt und in 1ml isotonischer NaCl-Lösung suspendiert. Die genotypische und phänotypische Charakterisierung der isolierten Stämme erfolgte am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg im Rahmen der dort laufenden EHEC-Routinediagnostik. Die Untersuchung umfaßte den Nachweis der Virulenzgene *stx1*, *stx2*, *stx2a*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *eae* und *hly* mittels PCR und Restriktionsenzymverdau bzw. die Enterohämolytinbildung auf Blutagar, die Verotoxinbildung im Verozelltest und die Sorbitfermentation auf SMAC-Agar. Zur Serotypisierung wurden die Stämme an Herrn Prof. J. Bockemühl, Hygiene Institut, Marckmannstr. 129a , 20 539 Hamburg geschickt.

Abschließend wurden die identifizierten Serovaren mit der von der World Health Organization veröffentlichten Liste aller bisher bekannten humanpathogenen STEC-Serovaren verglichen (Dr. K. BETTELHEIM, 1998).

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der parasitologischen Untersuchung

Von den 372 untersuchten Hundekotproben konnten in 82 Proben (22,0%) mit dem M.I.F.C - Verfahren (siehe Kap. 3.2.) Enteroparasiten nachgewiesen werden, 14 Proben von durchfallkranken Hunden wiesen mehr als eine Parasitenart auf.

Bei 38 Hunden (10,2%) war ein Befall mit Würmern festzustellen. Es handelte sich um durchfallkranke sowie um klinisch gesunde Jungtiere und um durchfallkranke adulte Hunde. Erwachsene Hunde ohne Durchfall waren bis auf ein Tier, das mit *Toxascaris leonina* befallen war, nicht betroffen. *Taenia spp.* und *Trichuris vulpis* waren nur bei durchfallkranken Hunden nachzuweisen (0,8% bzw. 5,7%). Im Gegensatz dazu konnten Ankylostomen und *Toxocara canis* auch bei gesunden Jungtieren nachgewiesen werden (gesund 3,7%, krank 4,6% bzw. gesund 2,8% und krank 5,7%). Gesunde erwachsenen Hunde waren nicht betroffen.

Ein Befall mit Protozoen war bei 49 Hunden (13,2%) festzustellen. Im Gegensatz zu den Kokzidien, die bei gesunden und durchfallkranken Hunden etwa gleich häufig nachgewiesen werden konnten (5,5% bzw. 6,5%), war die Giardienbefallsrate bei durchfallkranken Hunden etwa 4 mal höher als bei gesunden (10,6% bzw. 2,8%).

Ein deutlicher Unterschied in der Protozoenbefallsrate zeigte sich zwischen jungen und adulten Hunden. Unabhängig vom Gesundheitszustand waren Jungtiere sowohl mit Giardien als auch mit Kokzidien vier mal häufiger befallen als erwachsene Tiere (jung 14,0%, adult 3,4% bzw. jung 10,1%, adult 2,5%). Tabelle 4.1. gibt eine Übersicht zur Nachweishäufigkeit der verschiedenen Parasitenarten in den einzelnen Probandengruppen.

Tabelle 4.1.: Nachweishäufigkeit von Enteroparasiten

Parasitenart	G1 (n=57)	G2 (n=52)	K1 (n=112)	K2 (n=151)	G (n=109)	K (n=263)	Σ (n=372)
<i>Taenia spp.</i>	0	0	1 (0,9%)	1 (0,7%)	0	2 (0,8%)	2 (0,5%)
<i>Toxocara canis</i>	3 (5,3%)	0	11 (9,8%)	4 (2,6%)	3 (2,8%)	15 (5,7%)	18 (4,8%)
<i>Toxascaris leonina</i>	0	1 (1,9%)	1 (0,9%)	0	1 (0,9%)	1 (0,4%)	2 (0,5%)
<i>Trichuris vulpis</i>	0	0	1 (0,9%)	3 (2,0%)	0	4 (1,5%)	4 (1,1%)
<i>Ancylostomidae</i>	4 (7,0%)	0	7 (6,3%)	5 (3,3%)	4 (3,7%)	12 (4,6%)	16 (4,3%)
Giardien	2 (3,5%)	1 (1,9%)	22 (19,6%)	6 (4,0%)	3 (2,8%)	28 (10,6%)	31 (8,3%)
Kokzidien	5 (8,8%)	1 (1,9%)	13 (11,6%)	4 (2,6%)	6 (5,5%)	17 (6,5%)	23 (6,2%)

4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung

Die Keime wurden auf MacConkey II-Agar, Hektoen-Enterobacteriaceen-Agar und Columbia-Agar mit 5% Schafblut kultiviert und mittels API-Identifizierungssystem differenziert (siehe Kap.3.3). Tabelle 4.2.1. zeigt die Nachweishäufigkeit verschiedener fakultativ pathogener Keimarten in den einzelnen Probandengruppen.

E. coli - Bakterien mit hämolysierenden Eigenschaften auf Schafblutagar wurden bei gesunden und bei durchfallkranken Hunden etwa gleich häufig nachgewiesen (51,4% bzw. 54,4%). 15,1% der Proben waren positiv für *Proteus mirabilis*. Bei erwachsenen Hunden konnte diese Keimart aus 17,3% der Proben gesunder und aus 13,2% der Proben durchfallkranker Hunde kultiviert werden. Aus Proben klinisch gesunder Jungtiere gelang der Nachweis nur in 7,0% der Fälle. Proben durchfallkranker Jungtiere waren dagegen zu 20,5% positiv. Die übrigen Keimarten waren ebenfalls vorwiegend bei durchfallkranken Jungtieren nachzuweisen. Im Fall von

Enterobacter spp. und *Providentia spp.* waren ausnahmslos durchfallkranke Jungtiere betroffen (2,7% bzw. 0,9%). *Klebsiella spp.* waren bei durchfallkranken Jungtieren in 3,8% der Proben und bei gesunden und durchfallkranken adulten Tieren in 1,9% bzw. 2,0% der Proben nachzuweisen.

Citrobacter spp. konnten bei gesunden und bei durchfallkranken Jungtieren aus jeweils 1,8% der Proben kultiviert werden. In der Gruppe der adulten durchfallkranken Hunde war eine Probe positiv (0,7%).

Pseudomonas spp. konnten ausschließlich bei gesunden Jungtieren nachgewiesen werden (3,5%).

Tabelle 4.2.1.: Nachweishäufigkeit fakultativ pathogener Keime

	G1 (n=57)	G2 (n=52)	K1 (n=112)	K2 (n=151)	G (n=109)	K (n=263)	Σ (n=372)
<i>E. coli hämol.</i>	25 (43,9%)	31 (59,6%)	50 (44,6%)	93 (61,6%)	56 (51,4%)	143 (54,4%)	199 (53,5%)
<i>Proteus mirabilis</i>	4 (7,0%)	9 (17,3%)	23 (20,5%)	20 (13,2%)	13 (11,9%)	43 (16,3%)	56 (15,1%)
<i>Klebsiella spp.</i>	0	1 (1,9%)	4 (3,8%)	3 (2,0%)	1 (0,9%)	8 (3,0 %)	9 (2,4%)
<i>Citrobacter spp.</i>	1 (1,8%)	0	2 (1,8%)	1 (0,7%)	1 (0,9%)	3 (1,1%)	4 (1,1%)
<i>Enterobacter spp.</i>	0	0	3 (2,7%)	0	0	3 (1,1%)	3 (0,8%)
<i>Providencia spp.</i>	0	0	1 (0,9%)	0	0	1 (0,4%)	1 (0,3%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	2 (3,5%)	0	0	0	2 (1,8%)	0	2 (0,5%)

Tabelle 4.2.2. gibt eine Übersicht zur Nachweishäufigkeit von Salmonellen. Die Salmonellen wurden in Tetrathionate Broth Base und Selenite F-Broth angereichert und auf XLD-Agar und SMID-Agar kultiviert. Zur Gruppendifferenzierung wurde die Objektträgeragglutination mit verschiedenen Testseren eingesetzt (siehe Kap. 3.3).

Ergebnisse

Insgesamt waren 12 der 372 Kotproben Salmonellen-positiv (3,2%). Die positiven Proben stammten zum überwiegenden Teil von Jungtieren unabhängig vom Gesundheitszustand (5,3% der Jungtiere). Bei adulten Hunden waren Salmonellen ausschließlich in Proben durchfallkranker Hunde (1,5% der Adulten) nachzuweisen. Salmonellen der Gruppe B kamen bei gesunden und bei kranken Jungtieren gleich häufig vor (3,5% bzw. 3,6%), positiv war außerdem die Probe eines adulten kranken Hundes. Salmonellen der Gruppe C waren bei einem durchfallkranken erwachsenen Hund und Salmonellen der Gruppe D bei einem gesunden und zwei durchfallkranken Jungtieren nachzuweisen. In einem Fall eines durchfallkranken adulten Hundes konnten die nachgewiesenen Salmonellen keiner Gruppe zugeordnet werden.

Tabelle 4.2.2.: Nachweishäufigkeit von Salmonellen

	G1 (n=57)	G2 (n=52)	K1 (n=112)	K2 (n=151)	G (n=109)	K (n=263)	Σ (n=372)
<i>Salmonellen Gr. B</i>	2 (3,5%)	0	4 (3,6%)	1 (0,7%)	2 (1,8%)	5 (1,9%)	7 (1,9%)
<i>Salmonellen Gr. C</i>	0	0	0	1 (0,7%)	0	1 (0,4%)	1 (0,3%)
<i>Salmonellen Gr. D</i>	1 (1,8%)	0	2 (1,8%)	0	1 (0,9%)	2 (0,8%)	3 (0,8%)
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0	1 (0,7%)	0	1 (0,4%)	1 (0,3%)
Salmonellen ges.	3 (5,3%)	0	6 (5,4%)	3 (2,0%)	3 (2,8%)	9 (3,4%)	12 (3,2%)

Tabelle 4.2.3. zeigt die Nachweishäufigkeit von Yersinien. Die Keime wurden in Peptonwasser bei Zimmertemperatur angereichert und auf Yersinien-Agar kultiviert. Die Differenzierung erfolgte mittels API-Identifizierungssystem (siehe Kap. 3.3). Insgesamt konnten in 6,5% aller untersuchten Proben Yersinien nachgewiesen werden, wobei gesunde Hunde doppelt so häufig befallen waren wie durchfallkranke Tiere (11% der Gesunden bzw. 4,6% der Kranken). Im Gegensatz zu den Enteroparasiten und den Salmonellen, die bei Jungtieren häufiger nachzuweisen waren, als

bei adulten Hunden, konnte bei Yersinien ein altersabhängiger Unterschied in der Befallsrate nicht festgestellt werden. Proben von jungen Hunden waren zu 6,5% positiv und Proben adulter Hunde zu 5,9%.

Der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* gelang in 14 Proben (3,8%). Proben gesunder Hunde waren zu 4,6% positiv und Proben durchfallkranker Hunde zu 3,4%. *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* oder *Y. kristensenii* konnten in insgesamt 10 Proben nachgewiesen werden (2,7%). Proben gesunder Hunde waren 6 mal häufiger positiv für diese Yersinienarten als Proben durchfallkranker Hunde (6,4% der gesunden bzw. 1,1% der kranken). Bei Jungtieren mit Durchfall konnten diese Arten in keinem Fall nachgewiesen werden.

Tabelle 4.2.3.: Nachweishäufigkeit von Yersinien

	G1 (n=57)	G2 (n=52)	K1 (n=112)	K2 (n=151)	G (n=109)	K (n=263)	Σ (n=372)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3 (5,3%)	2 (3,8%)	5 (4,5%)	4 (2,6%)	5 (4,6%)	9 (3,4%)	14 (3,8%)
<i>Yersinia fredericsonii</i>	1 (1,8%)	1 (1,9%)	0	1 (0,7%)	2 (1,8%)	1 (0,4%)	3 (0,8%)
<i>Yersinia intermedia</i>	2 3,5%	1 (1,9%)	0	2 (1,3%)	3 (2,8%)	2 (0,8%)	5 (1,3%)
<i>Yersinia kristensenii</i>	1 (1,8%)	1 (1,9%)	0	0	2 (1,8%)	0	2 (0,5%)
Yersinien ges.	7 (12,3%)	5 (9,6%)	5 (4,5%)	7 (4,6%)	12 (11,0%)	12 (4,6%)	24 (6,5%)

4.3 Nachweishäufigkeit ausgewählter *E. coli* - Virulenzgene

Zum Nachweis von *E. coli* - Virulenzgenen wurden die 372 Kotproben auf MacConkey II - Agar ausgestrichen. Alle gewachsenen Bakterienkolonien wurden abgeschwemmt und mittels PCR auf die verschiedenen Virulenzgene untersucht. Die eingesetzten Primer waren komplementär zu den für das Invasionsplasmid der EIEC, das Virulenzplasmid der EAEC (pCVD₄₃₂) und für verschiedene Shigatoxine (Stx), das EHEC-Hämolyysin (Hly) und die Intimine der EHEC kodierenden Gensequenzen.

Die Gensequenz *invas* des Invasionsplasmids war in keiner Probe nachzuweisen. Zwei Proben waren positiv für die Sequenz *eagg* des Virulenzplasmids pCVD₄₃₂ der enteroaggregativen *E. coli* (0,5%). Wobei eine Probe von einem jungen gesunden Hund und eine Probe von einem durchfallkranken erwachsenen Hund stammte.

Shigatoxin - Gene konnten in 26 (7,0%) der 372 Proben nachgewiesen werden. Proben gesunder Hunde waren zu 8,3% und Proben durchfallkranker Hunde zu 6,5% *stx* - positiv. Unabhängig vom Gesundheitszustand waren Jungtiere mit 10,7% 2,5 mal häufiger betroffen als adulte Tiere mit 4,0%.

Das *stx*₁-Gen konnte in 3 der 372 untersuchten Proben nachgewiesen werden (0,8%). Positiv waren ausschließlich Proben von jungen Hunden, wobei ein Hund Durchfallssymptome zeigte und zwei Tiere keinen Durchfall hatten.

Zum Nachweis der Gene *stx*₂ und *stx*₂-Varianten wurden zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt. Primerpaar GK3/ GK4 ist komplementär zu den Sequenzen *stx*₂*B* und *stx*₂*cB* und Primerpaar LP43/ LP44 zu den Sequenzen *stx*₂*A*, *stx*₂*cA*, *stx*₂*eA* und *stx*₂*dA*. Da in jeder *stx*₁- positiven Probe zusätzlich auch *stx*₂- und *stx*₂-Varianten - Gene amplifiziert wurden (vgl. Tab. 4.8.a und Tab. 4.8.b), entspricht die Nachweishäufigkeiten der Gene *stx*₂- und *stx*₂-Varianten der Nachweishäufigkeit von *stx*- Genen insgesamt.

Das EHEC-Hämolyysin- Gen (*hlyA*) konnte in 9 Proben (2,4%) nachgewiesen werden. Durchfallproben waren zu 2,7% positiv, Proben von Hunden ohne Durchfall zu 1,8%.

Die Proben von gesunden Hunden stammten ausschließlich von Jungtieren. Proben von klinisch gesunden adulten Hunden waren in keinem Fall *hlyA*-positiv.

Intimin-Gene (*eae*) konnten in 163 Proben (43,8%) nachgewiesen werden. Proben gesunder und Proben durchfallkranker Hunde waren zu 49,5% bzw. 41,4% positiv. In Proben von jungen Hunden war das *eae*-Gen unabhängig vom Gesundheitszustand mit 66,3% doppelt so häufig nachzuweisen, wie in Proben adulter Hunde mit 35,0%. Tabelle 4.3. und Abbildung 4.3. zeigen die Nachweishäufigkeit der *E. coli*-Virulenzgene in den verschiedenen Probandengruppen.

Bleiben Proben, bei denen Enteroparasiten und Salmonellen nachgewiesen werden konnten in der Auswertung unberücksichtigt, verringert sich der Anteil *stx*-positiver Proben von 7,0% auf 5,3%. Bei den gesunden Hunden sinkt der Anteil *stx*-positiver Proben um 0,4% (von 8,3% auf 7,9%) und bei den durchfallkranken um 1,9% (von 6,5% auf 4,6%).

Der Anteil der Proben in denen das EHEC - Hämolysin - Gen *hly* nachgewiesen werden konnte bleibt sowohl in der Gesamtnachweishäufigkeit (2,4% aller Proben bzw. 2,5% der Proben ohne Enteroparasiten und Salmonellen), als auch bei durchfallkranken Hunden (2,7% bzw. 2,6%) konstant. Bei gesunden Hunden steigt der Wert leicht an (1,8% bzw. 2,2%).

Bei den Intimin - Genen bleibt die Nachweishäufigkeit ebenfalls konstant. Die Gesamtnachweishäufigkeit betrug bei allen Proben 43,8% und bei Proben ohne Enteroparasiten und Salmonellen 41,7%. Bei durchfallkranken Hunden lag der Anteil bei 41,4%, bzw. ohne Berücksichtigung der parasiten- und salmonellen-positiven Proben bei 40,9% und bei klinisch gesunden Hunden bei 49,5% bzw. 43,8%.

Von den beiden *eagg* - positiven Proben, waren in der Probe des adulten Hundes zusätzlich Parasiten nachzuweisen, was aber keinen Einfluß auf die Gesamtnachweisrate hatte (0,5% bei allen Proben bzw. 0,4% bei Proben ohne Enteroparasiten und Salmonellen).

Tabelle 4.3.: Nachweishäufigkeit ausgewählter E. coli - Virulenzgene in der Enterobacteriaceenflora klinisch gesunder und durchfallkranker Hunde

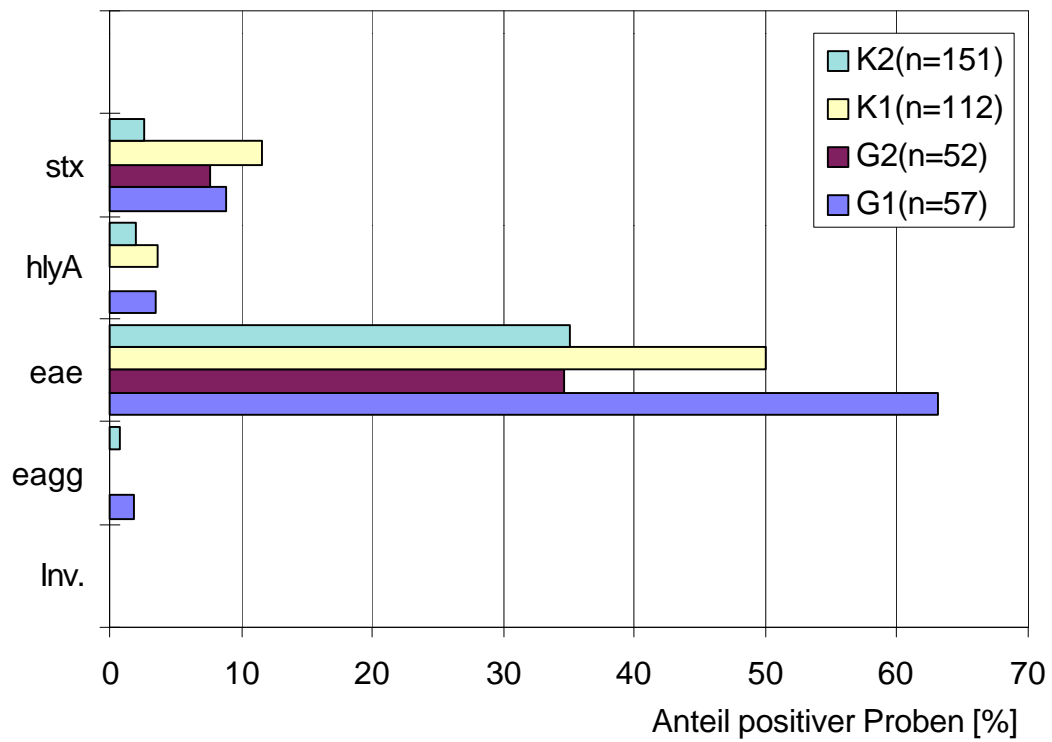
primerhomologe Gensequenz	G1 [57] [39] a	G2 [52] [49] a	K1 [112] [65] a	K2 [151] [128] a	G [109] [89] a	K [263] [193] a	G+K [372] [282] a
<i>stx1B</i>	2 3,5%	0 0,0%	1 0,9%	0 0,0%	2 1,8%	1 0,4%	3 0,8%
<i>stx2B, stx2cB</i>	1 1,8%	2 3,8%	2 1,8%	1 0,7%	3 2,8%	3 1,1%	6 1,6%
<i>stx2A, stx2cA,</i> <i>stx2eA, stx2dA</i>	5 8,8%	2 3,8%	11 9,8%	4 2,6%	7 6,4%	15 5,7%	22 5,9%
<i>hlyA</i>	2 3,5%	0 0,0%	4 3,6%	3 2,0%	2 1,8%	7 2,7%	9 2,4%
<i>eae</i>	36 63,2%	18 34,6%	56 50,0%	53 35,1%	54 49,5%	109 41,4%	163 43,8%
<i>eagg</i>	1 1,8%	0 0,0%	0 0,0%	1 0,7%	1 0,9%	1 0,4%	2 0,5%
<i>invas</i>	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
<i>stx</i> -positive Proben	5 8,8%	4 7,7%	13 11,6%	4 2,6%	9 8,3%	17 6,5%	26 7,0%
	3 7,5%	4 8,2%	7 10,8%	2 1,2%	7 7,9%	9 4,7%	15 5,3%

G: gesunde Hunde, K: durchfallkranke Hunde

(G bzw. K) 1: bis 6 Monate alt, (G bzw. K) 2: älter als 6 Monate

a: Proben bei denen weder Enteroparasiten noch Salmonellen nachgewiesen werden konnten

Abbildung 4.3.: Nachweishäufigkeit ausgewählter *E. coli*-Virulenzgene in der Enterobacteriaceenflora klinisch gesunder und durchfallkranker Hunde



4.3.1 Nachweis von Shigatoxinen

Im ersten Versuchsansatz wurden alle 372 Kotproben untersucht, wobei die Keimflora aus bei -20° C aufbewahrtem Kot angereichert wurde. Der anschließende Toxinachweis mittels EIA war bei allen Proben negativ.

Im zweiten Versuchsansatz wurden die in Glycerin konservierten, bei -20° C aufbewahrten Keimabschwemmungen zur Voranreicherung verwendet. Untersucht wurden nur die *stx₁B*- und die *stx₂B*-/ *stx₂CB*- positiven Proben (n=9). Der Toxinachweis gelang in 3 der 9 untersuchten Proben.

4.4 Korrelation zwischen *E. coli* - Virulenzgenen und Durchfallsymptomen

Tabelle 4.4. zeigt, daß Durchfallproben in denen das EHEC-Hämolysin- Gen nachgewiesen werden konnte mit 42,9% häufiger blutigen und mit 71,4% auch häufiger schleimigen Charakter hatten, als der Durchschnitt aller Durchfallproben mit 28,5%, bzw. 48,7%.

Eae- und *stx*- positive Proben waren jeweils mit 29,4% etwa gleich häufig blutig wie der Durchschnitt aller Durchfallproben. Schleimigen Charakter hatten 43,1% der *eae*-positiven aber nur 29,4% der *stx*-positiven Proben.

Eine erhöhte Anzahl Kotentleerungen wurde bei Hunden mit *hlyA*-, mit *stx*- und mit *eae*-positivem Kotprobenbefund in 57,1%, 70,6% bzw. 63,3% angegeben. Der Durchschnittswert lag bei 70,7%.

Der Anteil der Hunde die Körpergewicht verloren hatten war mit 14,3% bei *hlyA*-positivem und mit 13,3% bei *stx*- positivem Kotprobenbefund niedriger als der Vergleichswert von 26,2%. Bei *eae*- positiven Proben wurde in 28,4% der Fälle ein Körpergewichtsverlust angegeben.

Flatulenz und Meteorismus zeigten 35,3 % bzw. 17,6% der *stx*- positiven, 42,9% bzw. 28,6% der *hlyA*-positiven und 45,9% bzw. 35,8% der *eaeA*-positiven Hunde. Der Durchschnittswert lag bei 42,6% bzw. 31,6%.

In der *eagg*-positiven Probe waren zusätzlich hochgradig Hakenwurmeier nachweisbar (siehe Tab. 4.8.c), so daß die Durchfallsymptome wahrscheinlich auf den Hakenwurmbefall zurückzuführen sind.

Tabelle 4.4.: Durchfallsymptome von Hunden bei denen *E. coli*-Virulenzgene nachgewiesen wurden

Durchfall-symptome	<i>stx</i> (n=17)	<i>hlyA</i> (n=7)	<i>eae</i> (n=109)	<i>eagg</i> (n=1)	Σ Durchfallproben (n=263)
blutig	5 (29,4%)	3 (42,9%)	32 (29,4%)	1	75 (28,5%)
schleimig	5 (29,4%)	5 (71,4)	47 (43,1%)	1	128 (48,7%)
Zahl Kotentleerungen ↑	12 (70,6%)	4 (57,1%)	69 (63,3%)	1	186 (70,7%)
Körpergewicht ↓	2 (11,8%)	1 (14,3%)	31 (28,4%)	1	69 (26,2%)
Flatulenz	6 (35,3%)	3 (42,9%)	50 (45,9%)	1	112 (42,6%)
Meteorismus	3 (17,6%)	2 (28,6%)	39 (35,8%)	1	83 (31,6%)

4.5 Nachweishäufigkeit von *E. coli* - Virulenzgenen bei antibiotischer/ chemotherapeutischer Prämedikation

Die Daten zur antibiotischen/ chemotherapeutischen Prämedikation wurden dem vom Tierarzt ausgefüllten und zusammen mit der Probe eingesandten Untersuchungsantrag entnommen. Eine antibiotische/ chemotherapeutische Prämedikation wurde bei 22,4% der Hunde mit Durchfall angegeben.

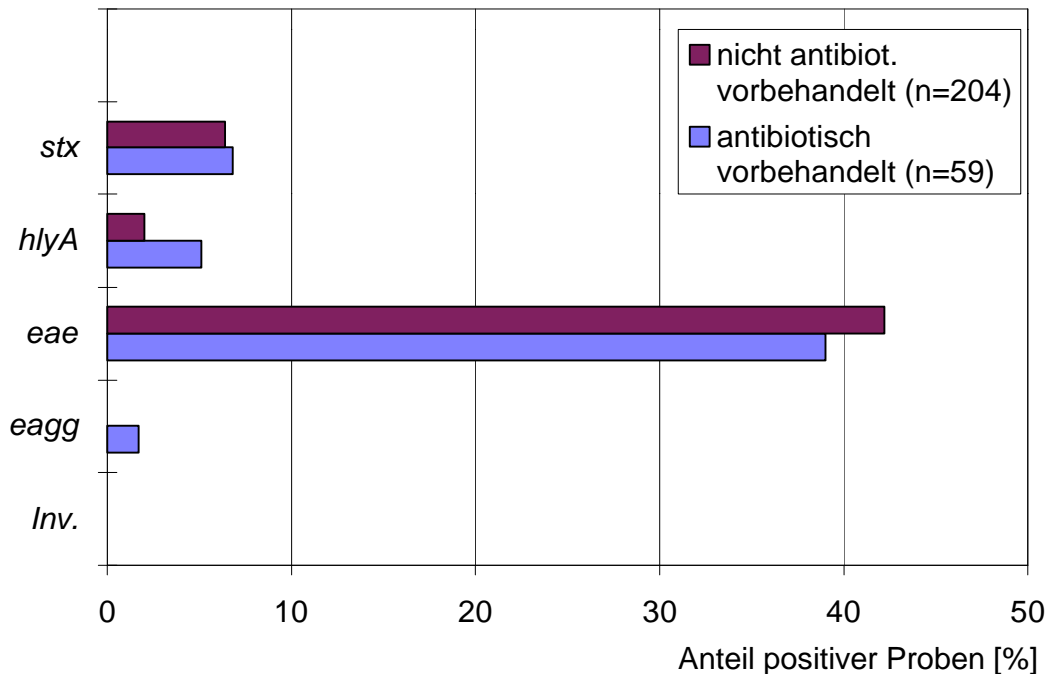
Tabelle 4.5. zeigt, daß das EHEC-Hämolyisingen in Proben antibiotisch/ chemotherapeutisch vorbehandelter Hunde (n=59) mehr als doppelt so häufig nachgewiesen werden konnte, als in Proben nicht vorbehandelter Hunde (n=204). Das *eagg*- Gen konnte in der Gruppe der antibiotisch/ chemotherapeutisch vorbehandelten Hunde jeweils in einer Probe nachgewiesen werden. Die Proben von nicht vorbehandelten Hunden waren alle *eagg*- negativ.

Stx- und Intimin- Gene wurden in Proben von vorbehandelten Hunden mit 6,8% bzw. 39,0% etwa gleich häufig nachgewiesen wie bei Hunden ohne Prämedikation mit 6,4% bzw. 42,2%. In Abb. 4.5. ist die Nachweishäufigkeit der verschiedenen Virulenzgene graphisch dargestellt.

Tabelle 4.5.: Nachweishäufigkeit von *E. coli*-Virulenzgenen bei antibiotischer/ chemotherapeutischer Prämedikation

Nachgewiesene Virulenzgene	antibiotisch/ chemotherapeutisch vorbehandelt (n=59)	nicht antibiot. vorbehandelt (n=204)	K (n=263)
<i>Stx</i>	4 (6,8%)	13 (6,4%)	17 (6,5%)
<i>HlyA</i>	3 (5,1%)	4 (2,0%)	7 (2,7%)
<i>Eae</i>	23 (39,0%)	86 (42,2%)	109 (41,4%)
<i>Eagg</i>	1 (1,7%)	0	1 (0,4%)
<i>Inv.</i>	0	0	0

Abbildung 4.5.: Nachweishäufigkeit von *E. coli*-Virulenzgenen bei antibiotischer/chemotherapeutischer Prämedikation



4.6 Nachweishäufigkeit von *E. coli* - Virulenzgenen in Abhängigkeit von der Fütterung

Die Daten zur Art der Fütterung wurden bei klinisch gesunden Hunden mittels Fragebogen erhoben, der vom Besitzer ausgefüllt wurde. Bei Hunden mit Durchfall wurden die entsprechenden Daten dem Untersuchungsantrag entnommen, der vom behandelnden Tierarzt ausgefüllt und zusammen mit der Kotprobe zur Untersuchung eingesandt worden war. Da bei Hunden mit Durchfall häufig nicht die Normalfütterung, sondern die Zusammensetzung der Durchfalldiät angegeben worden war, wurden nur Fütterungsdaten von gesunden Hunden ausgewertet.

Ergebnisse

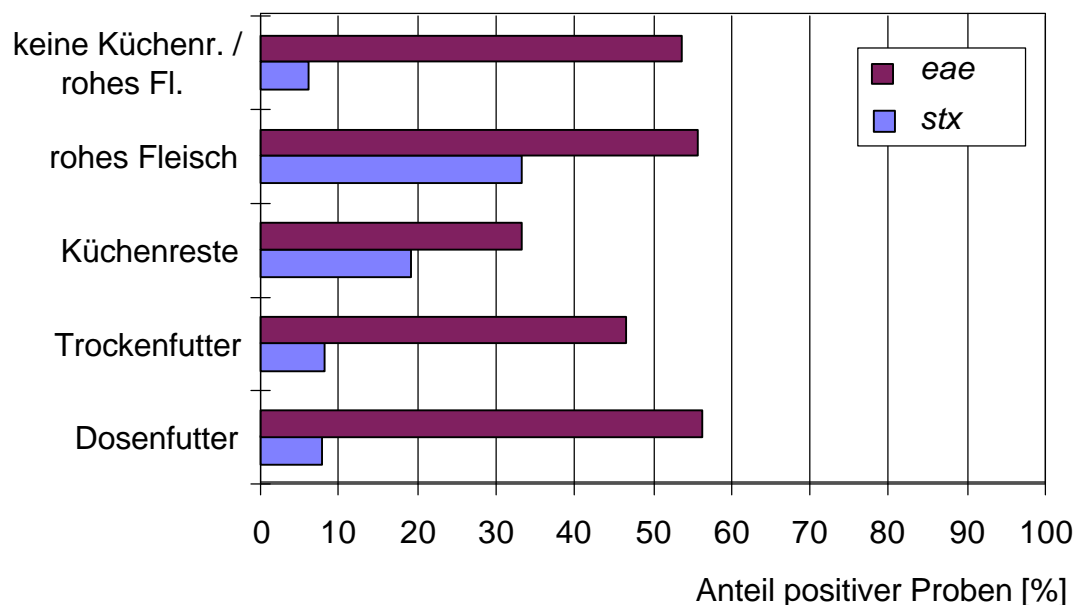
Tabelle 4.6. und Abb. 4.6. zeigen, daß *stx* -Gene häufiger in Proben von Hunden nachgewiesen werden konnten, die mit Küchenresten (19,0%) und insbesondere mit rohem Fleisch (33,3%) gefüttert wurden, als bei Hunden, die weder rohes Fleisch noch Küchenreste als Nahrung erhielten (6,0%).

Intimin- Gene waren am seltensten bei Hunden nachzuweisen, die mit Küchenresten gefüttert wurden.

Tabelle 4.6. : Nachweishäufigkeit verschiedener *E. coli*-Virulenzgenen in Abhängigkeit von der Fütterung bei Hunden ohne Durchfall

Primerhomologe Gensequenzen	Dosenfutter (n=64)	Trockenfutter (n=99)	Küchenreste (n=21)	rohes Fleisch (n=9)	keine Küchenr. / rohes Fl. (n=84)
<i>Stx</i>	6 (9,4%)	9 (9,1%)	4 (19,0%)	3 (33,3%)	5 (6,0%)
<i>HlyA</i>	2 (3,1%)	2 (2,0%)	1 (4,8%)	1 (11,1%)	1 (1,2%)
<i>Eae</i>	36 (56,25%)	46 (46,5%)	7 (33,3%)	5 (55,6%)	45 (53,6%)
<i>Eagg</i>	2 (3,1%)	2 (2,0%)	0	0	2 (2,4%)

Abbildung 4.6. : Nachweishäufigkeit von *stx*- und *eae*- Genen in Abhängigkeit von der Fütterung bei Hunden ohne Durchfall



4.7 Erregerisolierung und Serotypisierung

Wie aus Tabelle 4.7. ersichtlich konnten mittels Kolonienblot-Hybridisierung sieben shigatoxinbildende *E. coli*-Stämme (STEC) und ein enteroaggregativer *E. coli* - Stamm (EAEC) isoliert werden. Die isolierten STEC gehörten zu den Serovaren O22:H4, O112:H21, Rauhform H⁻, Ont*:H4, O96:H16, O30:H21, O60: H⁻. Der EAEC - Stamm konnte nicht typisiert werden. Nach der von der WHO veröffentlichten Liste aller bisher nachgewiesenen humanpathogenen STEC handelt es sich bei den hier isolierten STEC nicht um humanpathogene Serovare.

* nt = nicht typisierbar

Ergebnisse

Alle 7 isolierten STEC erwiesen sich als sorbitfermentierend und im Verozellzytotoxizitätstest als toxinbildend. Bei den Stämmen O112:H21 und O22:H4 war neben verschiedenen Shigatoxingenen das EHEC-Hämolsingen nachzuweisen. Diese beiden Stämme zeigten auch phänotypisch EHEC-Hämolyse.

Vergleicht man die Virulenumuster der isolierten STEC - Stämme mit den PCR - Screening - Ergebnissen der zugehörigen Proben ergeben sich folgende Abweichungen. Bei STEC O22:H4 war das EHEC-Hämolsin - Gen beim Screening nicht erfaßt worden. Im Gegensatz dazu hatte STEC O96:H16 kein *hlyA* - Gen. In der coliformen Keimflora der Probe, aus der dieser Stamm isoliert worden war, war das *hlyA* - Gen jedoch nachzuweisen. Intimin-Gene konnten bei keinem der isolierten STEC- Stämme nachgewiesen werden, obwohl beim Screening fünf der sieben Proben aus denen diese Stämme isoliert wurden *eaeA* - positiv waren.

Wie aus Tabelle 4.8.a, Tabelle 4.8.b und Tabelle 4.8.c ersichtlich ist, stammen die isolierten STEC von vier durchfallkranken und drei gesunden Hunden. Bei den gesunden Hunden handelt es sich um zwei Rüden im Alter von 16 Wochen bzw. einem Jahr und um eine 4 jährige Hündin. Die an Durchfall erkrankten Tiere waren eine 6 Wochen alte Hündin, ein 12 Wochen alter Rüde und zwei adulte Hündinnen im Alter von einem und zwei Jahren. Die 6 Wochen alte Hündin hatte schleimigen Durchfall. Aus ihrer Kotprobe konnte neben *E. coli* auch *Proteus mirabilis* kultiviert werden. Der 12 Wochen alte Rüde zeigte lediglich eine erhöhte Anzahl Kotentleerungen. Die einjährige Hündin hatte blutig schleimigen Durchfall, mit Flatulenz und Meteorismus und einer erhöhten Zahl Kotentleerungen. Die Durchfallsymptome der zweijährigen Hündin bestanden in einer erhöhten Anzahl Kotentleerungen und Flatulenz. Beide Tiere waren mit Hakenwürmern und die einjährige Hündin zusätzlich noch mit Spulwürmern befallen. Der EAEC stammt aus der Kotprobe eines durchfallkranken 8 Jahre alten Rüden mit blutig schleimigem Durchfall, einer erhöhten Zahl Kotentleerungen, Gewichtsverlust, Flatulenz und Meteorismus. Bei diesem Tier konnte ebenfalls ein Hakenwurmbefall nachgewiesen werden.

Tabelle 4.7.: Isolierte STEC- und EAEC - Stämme

isolierte Stämme						a						
E. coli - Gruppe	Genotyp	Enterohämolyse	Sorbit-Fermentation	Verotoxinbildung	Serovar	Probandengruppe						
							<i>hlyA</i>	<i>stx1B</i>	<i>stx2B, stx2cB</i>	<i>stx2A, stx2cA, stx2eA, stx2d</i>	<i>eaeA</i>	<i>eagg</i>
STEC	<i>stx2d</i>		x	x	O96:H16	G1	X			X	X	
STEC	<i>stx2a, stx2e</i>		x	x	O60:H-	G2				X	X	
STEC	<i>stx2 stx2d</i>		x	x	Rauf. H-	G2			X		X	
STEC	<i>hly, stx1, stx2</i>	x	x	x	O112:H21	K1	X	X		X		
STEC	<i>stx2c</i>		x	x	O30:H21	K1				X		
STEC	<i>hly, stx2, stx2d</i>	x	x	x	O22:H4	K2			X	X	X	
STEC	<i>stx2c</i>		x	x	Ont:H4	K2	X			X	X	
EAEC	<i>eagg</i>				nt	K2						X

a: primerhomologe Gensequenzen in der kultivierten Enterobacteriaceenflora

nt: nicht typisierbar

4.8 Anamnesedaten und Untersuchungsergebnisse von Hunden bei denen *stx*- *hly*- oder *eagg*- Gene nachgewiesen worden waren

Die Tabellen 4.8.a, 4.8.b und 4.8.c geben eine Übersicht zu sämtlichen Anamnesedaten und Untersuchungsergebnissen von allen gesunden bzw. an Durchfall erkrankten Hunden, bei denen *stx* - *hlyA*- oder *eagg* - Gene in der kultivierten enteralen Keimflora nachgewiesen werden konnten.

Stx- positiv waren insgesamt 26 Proben. Bei vier Proben war zusätzlich das *hlyA* - Gen und bei 13 Proben waren zusätzlich *eaeA*- Gene nachzuweisen (15,4% bzw. 50,0% der *stx*- positiven). Auffällig ist, daß in 4 von insgesamt 6 Proben in denen Gensequenzen amplifiziert wurden, die für die B-Untereinheiten der Toxine Stx2 bzw. Stx2c kodieren, für die entsprechenden A- Untereinheiten dieser Toxine kodierende Gene nicht erkannt wurden. Das EHEC - Hämolysin- Gen konnte in 9 Proben nachgewiesen werden, wobei nur 4 Proben zusätzlich auch *stx*- positiv waren (44,4%). *EaeA*- Gene wurden wie erwartet in 16 (48,5%) der insgesamt 33 Proben amplifiziert (vgl. Tab. 4.3.). Auffällig ist jedoch, daß bei den gesunden Hunden in 9 von 10 Proben (90,0%) *eaeA*- Gene nachgewiesen werden konnten.

17 der insgesamt 26 *stx*- positiven Proben stammen von durchfallkranken Hunden. Neun dieser 17 Tiere waren mit Enteroparasiten oder Salmonellen befallen und bei drei Tieren konnte *Proteus mirabilis* aus der Kotprobe kultiviert werden. Bei den verbleibenden vier Hunden wurden keine obligat oder fakultativ pathogenen Keime nachgewiesen.

Aus sieben Proben von durchfallkranken Hunden konnte das *hlyA*- Gen amplifiziert werden. Zwei dieser 7 Hunde waren zusätzlich *stx*- positiv und darüber hinaus mit Würmern befallen. Aus 2 Proben konnte *Proteus mirabilis* kultiviert werden und eine Probe war Giardien- positiv. In den verbleibenden zwei Proben waren keine obligat oder fakultativ pathogenen Keime nachweisbar.

Das *eagg*- Gen konnte aus einer Probe eines durchfallkranken Hundes amplifiziert werden. Der betreffende Hund war darüber hinaus zusätzlich hochgradig mit Hakenwürmern befallen.

4.9 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Michael Ratz vom Lehrstuhl für Statistik der Universität Würzburg statistisch ausgewertet. Aufgrund der Vielzahl der erfaßten Parameter und der Heterogenität der erzielten Untersuchungsergebnisse erwies sich eine statistische Bewertung jedoch als wenig sinnvoll.

Tabelle 4.8.a : Anamnesedaten und Untersuchungsergebnisse klinisch gesunder Hunde in deren Enterobacteriaceenflora *stx*-, *hlyA*- oder *eagg*- Gene nachgewiesen werden konnten

Hund	Futter	Parasiten **	Enterobacteriaceae ***	primethomologe Gensequenzen
Gruppe Geschlecht Alter	Dosenfutter Trockenfutter Küchenreste rohes Fleisch	Toxocara canis Ankylostoma sp. Giardia sp. Kokzidien	E. coli E. coli hämol. Citrobacter spp. Proteus mirabilis Providencia spp. Salmonellen Gruppe D Salmonellen Gr. B Yersinia intermedia	<i>hlyA</i> <i>stx</i> ₁ <i>B</i> <i>stx</i> ₂ <i>B</i> , <i>stx</i> ₂ <i>cB</i> <i>stx</i> ₂ <i>A</i> , <i>stx</i> ₂ <i>cA</i> , <i>stx</i> ₂ <i>eA</i> <i>eaeA</i> Serotypen isolierter STEC (siehe Tab. 4.7.)
G1 M 5M	X X X X		s	X X X X
G1 M 6M	X X	1	100%	X X X X
G1 W 3M	X X		s s	X X X X
G1 M 4M	X X		100%	X X X X
G1 M 4M	X X X X	2	100% 10%	X X X X
G1 M 2M	X X		s s	X X X X
G2 M 14J	X X X X		100% 90%	X
G2 M 1J	X X X		100%	X X X X
G2 W 4J	X		100% 100%	X X X X
G2 W 3J	keine Angaben		s	X X X X

** 1 = geringradiger; 2 = mittelradiger; 3 = hochradiger Befall

*** s = schwaches Wachstum (d.h. im 3-Ösen-Ausstrich Wachstum nur in Impfstrich eins), bei stärkerem

Wachstum wurde der Anteil der gewachsenen Kolonien am gesamten Keimwachstum in % angegeben

G: gesunde Hunde, K: durchfallkranke Hunde, (G bzw. K) 1: bis 6 Monate alt, (G bzw. K) 2: älter als 6 Monate

Tabelle 4.8.b: Anamnesedaten und Untersuchungsergebnisse durchfallkranker junger Hunde in deren Enterobacteriaceenflora *stx*-, *hlyA*- oder *eagg*- Gene nachgewiesen werden konnten

Hund	Durchfallsymptome	Futter	Parasiten **	Enterobacteriaceae ***	primerhomol. Gensequ.	Serotypen isolierter STEC (siehe Tab. 4.7.)
Alter	Meteorismus	rohes Fleisch	Kokzidien	Yersinia interm.	<i>eagg</i>	O112:H21
Geschlecht	Flatulenz	Küchenreste	Giardia sp.	Salmonellen Gr.B	<i>eaeA</i>	
Gruppe	Gewichtsabn.	Trockenfutter	Ankylostoma sp.	Salmonellen Gr.D	<i>stx₂A, stx₂CA, stx₂DA, stx₂EA</i>	
	Zahl Kotentl.	Dosenfutter	Toxocara canis	Providencia spp.	<i>stx₂B, stx₂CB</i>	
	schleimig	vorbehandelt *		Proteus mirabilis	<i>stx₁B</i>	
	blutig			Citrobacter spp.	<i>hlyA</i>	
K1 M 4M	X	X	1	E. coli hämol.	X	O30:H21
K1 W 1,5M	X	X	2	E. coli	X	
K1 W 2M	X	X	2	100% 20%	X	
K1 W 5M	>2	X	3	90%	X	
K1 W 3M	2 bis 3	X	1	10%	X	
K1 M 6M	>2	X	2	10%	X	
K1 M 3M	>2	X		10%	X	
K1 M 3M	X 5 bis 6	X		10%	X	
K1 M 4M	3	X		10%	X	
K1 W 3M	4	X	1	10%	X	
K1 W 2M	6 bis 8	X		10%	X	
K1 W 6M	3	X		10%	X	
K1 M 2M	>5	X	1	10%	X	
K1 W 1,25M	X	X	2	10%	X	
K1 W 4M	X	X		10%	X	
K1 M 5,5M	X 3 bis 4	X		10%	X	
K1 W 4,5M	X	X		10%	X	

* antibiotisch/ chemotherapeutisch *** 1 = geringradiger; 2 = mittelradiger; 3 = hochgradiger Befall nt = nicht typisierbar
 *** s = schwaches Wachstum (d.h. im 3-Ösen-Ausstrich Wachstum nur in Impfstrich eins), bei stärkerem Wachstum wurde der Anteil der gewachsenen Kolonien am gesamten Keimwachstum in % angegeben

G: gesunde Hunde, K: durchfallkranke Hunde, (G bzw. K) 1: bis 6 Monate alt, (G bzw. K) 2: älter als 6 Monate

Tabelle 4.8.c: Anamnesedaten und Untersuchungsergebnisse durchfallkranker adulter Hunde in deren Enterobacteriaceenflora *stx*-, *hlyA*- oder *eagg*- Gene nachgewiesen werden konnten

Hund	Durchfallssymptome	Futter	Parasiten **	Enterobacteriaceae ***	primerhomologe Gensequenzen	Serotypen isolierter STEC (siehe Tab. 4.7.)
Gruppe						
Geschlecht						
Alter						
K2 W 2J	blutig schleimig Zahl Kotentl. 3 Gewichtsabn. X Flatulenz X Meteorismus M		1	100% E. coli E. coli hämol. Citrobacter spp. Proteus mirabilis Providencia spp. Salmonellen Gr. D Salmonellen Gr. B Yersinia intermedia	<i>hlyA</i> <i>stx</i> ₁ <i>B</i> <i>stx</i> ₂ <i>B</i> , <i>stx</i> ₂ <i>cB</i> <i>stx</i> ₂ <i>A</i> , <i>stx</i> ₂ <i>cA</i> , <i>stx</i> ₂ <i>dA</i> , <i>stx</i> ₂ <i>eA</i> <i>eaeA</i> <i>eagg</i>	O22:H4
K2 M 1J	3 bis 4 X M	X X		100% 30% s	X X	
K2 9J	4 bis 5 X	X X		s s	X X	
K2 W 2J	X >2			s s 10%	X	
K2 W 8J	X X 6 bis 10 X X	X X	3	100% 90% 30% 10%	X X	nt
K2 W 1J	X X 2 bis 3 X X	X X	1 2	90% 30% 10%	X X X	Ont:H4

* antibiotisch/chemotherapeutisch

*** s = schwaches Wachstum (d.h. im 3-Ösen-Ausstrich Wachstum nur in Impfstrich eins), bei stärkerem Wachstum wurde der Anteil der gewachsenen Kolonien am gesamten Keimwachstum in % angegeben

G: gesunde Hunde, K: durchfallkranker Hunde, (G bzw. K) 1: bis 6 Monate alt, (G bzw. K) 2: älter als 6 Monate

5 Besprechung der Ergebnisse

Enterohämorrhagische (EHEC), enteroaggregative (EAEC) und enteroinvasive (EIEC) *E. coli* sind als Krankheitserreger beim Menschen beschrieben. Um einen Einblick zu gewinnen, ob Hunde ein Reservoir für diese Erreger darstellen und ob diese Erreger als Durchfallursache für Hunde klinische Relevanz besitzen, wurden Kotproben von 109 gesunden und 269 durchfallkranken Hunden auf das Vorhandensein verschiedener Virulenzgene der EHEC, EAEC und EIEC untersucht. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte unter Berücksichtigung von Ergebnissen der parasitologischen und mikrobiologischen Kotprobenuntersuchung sowie verschiedener Anamnesedaten.

Ergebnisse der parasitologischen und mikrobiologischen Kotprobenuntersuchung

Anhand der parasitologischen und mikrobiologischen Untersuchung sollte das Spektrum möglicher Durchfallursachen eingegrenzt werden. Dazu wurden die nachgewiesenen Parasiten- und Bakterienarten aufgrund ihrer unterschiedlichen Prävalenz bei gesunden und kranken Hunden in durchfallverursachend und nicht durchfallverursachend eingeteilt. Außerdem wurden Kriterien für den Nachweis von Durchfallerregern definiert, die im Folgenden dazu dienten, die pathogene Bedeutung der nachgewiesenen *E. coli* - Bakterien einzuschätzen.

Um die bei Jungtieren noch unvollständig entwickelte enterale Immunität berücksichtigen zu können, wurden sowohl die durchfallkranken als auch die gesunden Hunde nach Jungtieren (bis 6 Monate alt) und adulten Hunden (älter als 6 Monate) getrennt ausgewertet.

Besprechung der Ergebnisse

Hinsichtlich der Häufigkeit mit der Enteroparasiten vorkamen ergab sich folgendes Bild. Helminthen konnten in 9,4% der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Befallen waren durchfallkranke aber auch klinisch gesunde Hunde (11,4% bzw. 7,3%). Jedoch handelte es sich bei den gesunden Hunden nur in einem Fall um ein adultes Tier, bei dem Spulwürmer der Art *Toxascaris leonina* nachgewiesen wurden. Die übrigen Tiere waren Jungtiere mit Spul- oder Hakenwurmbefall. Band- und Peitschenwürmer kamen ausschließlich bei durchfallkranken Tieren vor.

Die Ursache für den Spul- und Hakenwurmbefall junger Hunde ist sicher im galaktogenen und intrauterinen Übertragungsweg dieser Parasiten zu sehen, der zu einem hohen latenten Durchseuchungsgrad bei Hundewürfen führt. So konnten GOTHE u. REICHLER (1990) in 67 von 100 untersuchten Hundewürfen *Toxocara canis* und in 6 Ankylostomen nachweisen.

Giardien und Kokzidien kamen in den eigenen Untersuchungen sowohl bei durchfallkranken als auch bei klinisch gesunden Hunden in beiden Altersgruppen vor, wobei bei den adulten gesunden Hunden wiederum nur jeweils ein Tier betroffen war. Giardien waren bei durchfallkranken Hunden ohne Berücksichtigung des Alters der Tiere vier mal häufiger nachzuweisen, als bei gesunden (10,6% bzw. 2,8%). Für die Kokzidien konnte ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden (6,5% der Kranken bzw. 5,5% der Gesunden). Die Ursache ist wohl darin zu sehen, daß zwischen pathogenen und apathogenen Kokzidienarten nicht unterschieden wurde.

Nach Literaturangaben verlaufen Enteroparasiteninfektionen bei Hunden oft subklinisch (MEHLHORN 1993, NIEMAND und SUTER 1994). Nach eigenen Untersuchungen traten latente Infektionen vor allem bei Jungtieren auf. Adulte Hunde waren nur in Einzelfällen inapparent infiziert. Das Auftreten von Enteroparasiten wurde deshalb als durchfallverursachend bewertet.

Der Nachweis von Salmonellen gelang in 3,2% der 372 untersuchten Proben. Betroffen waren durchfallkranke und gesunde Jungtiere in etwa gleicher Häufigkeit (5,4% bzw. 5,3%), sowie adulte durchfallkranke Hunde (2%). Bei adulten gesunden Hunden konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden.

Nach Literaturangaben werden Salmonelleninfektionen bei Hunden nur selten klinisch manifest, darüber hinaus sind bei dieser Tierart im Gegensatz zu anderen Haus- und Nutztieren und zum Menschen keine speziesadaptierten Serovaren bekannt, weshalb Salmonellen bei Hunden nicht als obligat pathogene Keime betrachtet werden (NIEMAND und SUTER 1994, AMTSBERG und KIRPAL 1978, WEBER et al., 1995; HARTUNG und HELMUTH 1998).

Da Salmonellen nach eigenen Untersuchungen bei adulten Hunden ausschließlich im Zusammenhang mit Durchfallsymptomen nachgewiesen werden konnten, wurde der Nachweis dieser Erreger im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls als durchfallverursachend bewertet.

Ein völlig anderes Bild ergab sich bei der Auswertung der Yersinien- Befunde. Klinisch gesunde Hunde waren unabhängig von der jeweils nachgewiesenen Yersiniensart häufiger befallen als durchfallkranke. Außerdem kamen diese Keime auch bei adulten gesunden Hunden vor. Nach ALECSIC´ et al. (1987) handelt es sich bei den meisten Yersinienarten um apathogene Umweltkeime. Klinisch manifeste Yersiniosen wurden bei Hunden nur infolge von *Yersinia enterocolitica*- Infektionen und nur in seltenen Einzelfällen beschrieben (PAPAGE-ORGES et al., 1983; FARSTADT et al., 1976). Die Yersinien wurden deshalb als nicht durchfallverursachend bewertet.

Ebenso als nicht durchfallverursachend eingestuft wurden hämolysierende *E. coli*- Bakterien, da diese sowohl bei durchfallkranken, als auch bei klinisch gesunden adulten Hunden in über der Hälfte der untersuchten Proben nachgewiesen werden konnten (61,6% bzw. 59,6%). Durchfallkranke und gesunde Jungtiere waren ebenfalls etwa gleich häufig befallen (44,6% bzw. 43,9%).

Proteus mirabilis kam bei durchfallkranken Jungtieren drei mal häufiger vor, als bei klinisch gesunden jungen Hunden. Ebenso waren *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, und *Enterobacter spp.* vorwiegend bei jungen durchfallkranken Hunden nachzuweisen. Da diese Keime jedoch meistens zusammen mit anderen Durchfallerregern wie Enteroparasiten oder Salmonellen auftraten und für adulte Hunde kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis dieser Keime und dem Auftreten von Durchfall fest-

Besprechung der Ergebnisse

gestellt werden konnte, wurde ihr Nachweis nicht als primär durchfallverursachend, sondern als Zeichen einer Dysbiose bewertet.

Im Vergleich zu adulten Tieren waren Jungtiere häufiger latent mit Durchfallerregern infiziert. Wahrscheinlich ist bei Jungtieren aufgrund der verzögerten Immunreaktion bei noch nicht bestehender Immunität eine geringe nicht durchfallverursachende Besiedelung des Verdauungskanals mit diesen Erregern möglich. Bei adulten Tieren scheinen inapparente Infektionen dagegen in den meisten Fällen durch eine belastbare Immunität verhindert zu werden. Eine nachweisbare Besiedelung ist hier wohl überwiegend ein Zeichen dafür, daß enterale Abwehrmechanismen überwunden und pathologische Prozesse in Gang gesetzt wurden. Ob die nachgewiesenen Erreger im Einzelfall Durchfall auslösen, wird dabei von einer Vielzahl endogener und exogener Faktoren, wie z. B. der Gesamtkeimbelastung und der Kondition des Wirtorganismus beeinflusst.

Um die pathogene Bedeutung der nachgewiesenen Virulenzfaktoren von *E. coli* beurteilen zu können, wurden aufgrund eigener Beobachtungen folgende Kriterien für den Nachweis von Durchfallerregern definiert: Durchfallerreger kommen bei kranken Hunden häufiger vor als bei gesunden, und bei gesunden adulten Hunden sind sie nicht oder nur in Einzelfällen nachzuweisen.

Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung

Die Ergebnisse der Untersuchung auf verschiedene Virulenzgene von *E. coli* wurden zum einen unter Berücksichtigung aller Proben und zum andern unter Ausschluß derjenigen Proben, bei denen Enteroparasiten und Salmonellen nachgewiesen wurden ausgewertet. Aus dem Vergleich dieser beiden getrennten Auswertungen konnten jedoch keine Hinweise auf eine mögliche durchfallverursachende Wirkung der verschiedenen Virulenzgene, oder ein gekoppeltes Auftreten dieser Gene mit

Enteroparasiten oder Salmonellen abgeleitet werden. Im Fall von *stx1B*, *hlyA*, und *eagg* war die Nachweishäufigkeit insgesamt zu gering und für *stx2* und Varianten von *stx2* sowie für die *eae* - Gene waren Gruppenprimer benutzt worden, so daß hier zwischen wahrscheinlich verschieden virulent wirkenden Genprodukten nicht differenziert werden konnte. Der ursprüngliche Plan, Proben mit positivem Salmonellen- oder Enteroparasitenbefund aus der weiteren Auswertung auszuschließen wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Die Virulenzgene von *E. coli* waren in folgender Häufigkeit nachzuweisen. Gensequenzen des Invasionsplasmids der EIEC konnten aus keiner der untersuchten 372 Proben amplifiziert werden, so daß Hunde wohl kein Reservoir für diese Erreger darstellen. Vergleichsdaten zur Prävalenz dieser Keime bei Hunden und anderen Haustieren sind nicht bekannt. Bisher wurden EIEC ausschließlich beim Menschen nachgewiesen, wo sie weltweit für etwa 1-4% der Durchfallerkrankungen verantwortlich gemacht werden (BEUTIN 1990). Für Hunde besitzen diese Erreger nach eigenen Untersuchungen keine klinische Relevanz.

EIEC lassen sich sowohl biochemisch wie auch in ihrem Pathogenitätsmodell und ihrer den Shigellen vergleichbaren intrazellulären Lebensweise deutlich gegen andere pathogene *E. coli* - Bakterien abgrenzen, außerdem ist ihre Verbreitung im Gegensatz zu anderen *E. coli* - Gruppen wie z. B. den STEC oder den EPEC auf nur wenige Serovaren beschränkt, so daß es sich bei den EIEC möglicherweise um ausschließlich an den Menschen adaptierte streng wirtsspezifische *E. coli* - Bakterien handelt (DU PONT et al., 1971; TOLEDO et al., 1983; ØRSKOV et al., 1991).

Die Gensequenz *eagg* des Virulenzplasmids *pCVD₄₃₂* der EAEC konnte aus 2 Proben amplifiziert werden (0,5%). Wie bei den EIEC gibt es zur Prävalenz dieser Keime bei Hunden bisher keine Untersuchungen. Auch für andere Tierarten liegen keine Daten zur Nachweishäufigkeit vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß humane EAEC im Tiermodell bei Ratten, Kaninchen und Schweinen Enteritissymptome hervorrufen können (VIAL et al., 1988; TZIPORI et al., 1992). Beim Menschen ins-

Besprechung der Ergebnisse

besondere bei Kindern sind EAEC als Erreger chronisch wäßriger Durchfälle beschrieben. In Deutschland werden sie für etwa 2% der Durchfälle im Kindesalter verantwortlich gemacht (HUPPERTZ et al., 1997).

Die beiden *eagg*- positiven Proben aus den eigenen Untersuchungen stammen von einem zwei Monate alten klinisch gesunden männlichen Welpen und von einer achtjährigen adulten Hündin mit blutig schleimigem Durchfall. Die Durchfallsymptome der adulten Hündin wurden aber wahrscheinlich nicht durch EAEC - Bakterien sondern durch einen außerdem nachgewiesenen hochgradigen Befall mit Hakenwürmern hervorgerufen. Ob EAEC- Bakterien bei Hunden als Durchfallerreger vorkommen, kann deshalb nicht beurteilt werden.

Neben ihrer durchfallverursachenden Wirkung scheinen EAEC - Bakterien aber noch eine weitere, wahrscheinlich sogar bedeutendere Eigenschaft zu besitzen, sie werden mit kindlichen Wachstumsverzögerungen in Verbindung gebracht. Die Ursache ist vermutlich ein Malabsorptionssyndrom, das durch die erhebliche Schleimproduktion, die EAEC - Bakterien an der Darmmukosa induzieren hervorgerufen wird (KARCH 1999, persönl. Mitt.). Ähnliche Vorgänge könnten auch bei infizierten jungen Hunden zum Kümern führen. Zur Klärung dieser Fragestellung wäre es interessant das Vorkommen von EAEC- Bakterien in Hundewürfen zu untersuchen.

Beim Menschen wurden bisher keine typischen Infektionsquellen und Übertragungswege für EAEC- Bakterien identifiziert. In den eigenen Untersuchungen konnte aufgrund der geringen Nachweishäufigkeit der Erreger kein Zusammenhang zwischen einer EAEC- Infektion und bestimmten Futtermitteln festgestellt werden.

Wegen der niedrigen Prävalenz der EAEC kann das vom Hund ausgehende Infektionsrisiko für den Menschen als gering beurteilt werden.

Ein wichtiges Virulenzmerkmal enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC) ist die Bildung des plasmidkodierten EHEC- oder Entero- Hämolysin (BEUTIN et al., 1988). Das kodierende Gen *hlyA* wurde in 9 der 372 untersuchten Proben nachgewiesen (2,4%). Zwei Proben stammen von klinisch gesunden und vier Proben von durchfallkranken Jungtieren (3,5% bzw. 3,6%). Bei den drei *hlyA*-positiven Proben adulter

Hunde handelte es sich ausschließlich um Proben durchfallkranker Tiere (2,0%). Gesunde adulte Hunde wiesen keine *hlyA*-Gene auf. Bemerkenswert erscheinen die Parallelen zur Nachweishäufigkeit von Salmonellen, die wie *hlyA* bei durchfallkranken Tieren häufiger als bei gesunden und bei durchfallkranken adulten, nicht aber in der Gruppe der gesunden adulten Hunde nachgewiesen werden konnten. Enterohämolyse - bildende *E. coli* erfüllen damit die in den eigenen Untersuchungen definierten Nachweiskriterien für Durchfallerreger. KRAMPE (1995) vermutete ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen dieser Bakterien und dem Auftreten von Durchfall beim Hund. Er konnte in 5,5% von 182 Kotproben durchfallkranker Hunde EHEC- Hämolyse - bildende *E. coli* nachweisen. Im Gegensatz dazu wird die pathogene Bedeutung des EHEC - Hämolyseins für den Menschen als eher gering bewertet. Hier hatte es zunächst vor allem diagnostische Bedeutung. BEUTIN et al. (1990) konnten zeigen, daß 89% der EHEC- Stämme Enterohämolyse besitzen und aufgrund dieser Eigenschaft mittels des Enterohämolyse - Agars nachgewiesen werden können. Da sich das Erregerspektrum mittlerweile jedoch verschoben hat und der Anteil Enterohämolyse - bildender EHEC auf nur noch 75% zurückgegangen ist, hat dieses Nachweisverfahren als Screeningtest an Bedeutung verloren (BOCKEMÜHL et al. 1997). Nach eigenen Untersuchungen wiesen 2 von insgesamt 7 isolierten Shigatoxin - bildenden *E. coli*- Stämmen zusätzlich auch Enterohämolysebildung auf (28,6%). KRAMPE (1995) konnte bei von Hunden isolierten *E. coli*- Stämmen keinen Zusammenhang zwischen Enterohämolyse - und Shigatoxinbildung beobachten.

3 der 7 *hlyA* - positiven Durchfallproben hatten blutigen und 5 hatten schleimigen Charakter (42,9% bzw. 71,4%). Im Vergleich dazu war der Durchschnitt aller untersuchten Durchfallproben nur zu 28,5% blutig und zu 48,7% schleimig. Einschränkend muß jedoch berücksichtigt werden, daß in 2 der 7 *hlyA*- positiven Proben zusätzlich Enteroparasiten nachgewiesen wurden. Die beiden Proben stammten von einem 3 Monate alten weiblichen Welpen mit Giardien- und einer einjährigen Hündin mit Spul- und Hakenwurmbefall. Beide Tiere zeigten Blut- und Schleimbeimengungen im Kot, eine erhöhte Anzahl Kotentleerungen, Flatulenz und Meteorismus. Wur-

Besprechung der Ergebnisse

den diese Proben nicht berücksichtigt sank der Anteil der *hly* - positiven Proben mit blutigem Charakter auf 20,0% und der mit schleimigem auf 60,0%. Andererseits konnten bei einem 8 Monate alten Welpen mit *hly*- positivem Kotprobenbefund, der vergleichbare Symptome und zusätzlich noch Körpergewichtsverlust aufwies, keine anderen durchfallverursachenden Erreger nachgewiesen werden. Es kann deshalb vermutet werden, daß Enterohämolysin- bildende *E. coli* in der Lage sind schwerwiegende Durchfallerkrankungen auszulösen, wahrscheinlich ist ihre pathogene Bedeutung aber vor allem darin zu sehen, daß sie in Zusammenhang mit anderen Durchfallursachen den Krankheitsverlauf erschweren können.

Ein Zusammenhang zwischen bestimmten Futtermitteln und dem Auftreten von Enterohämolysin - bildenden *E. coli* konnte nicht festgestellt werden, da ausschließlich Fütterungsdaten von gesunden Hunden ausgewertet wurden und das *hlyA*- Gen in dieser Gruppe nur in 2 Fällen nachgewiesen worden war.

Bemerkenswert erscheint, daß *hlyA* bei antibiotisch oder chemotherapeutisch vorbehandelten Hunden häufiger vorkam, als bei nicht vorbehandelten Hunden (5,1% bzw. 2,0%). Möglicherweise erhalten Enterohämolysin- bildende *E. coli* durch den Einsatz von Breitspektrumantibiotika oder breit wirkenden Chemotherapeutika, der in vielen Tierarztpraxen immer noch zur Standardtherapie bei Durchfall gehört, einen Selektionsvorteil.

Zum vollen Virulenzmuster der EHEC gehört das Intiminbildungsvermögen. Intimine sind chromosomal kodierte Oberflächenproteine, die eine sehr enge Anheftung der Bakterien an die Wirtszellmembran ermöglichen und Umstrukturierungsprozesse im Zytoskelett der Wirtszellen hervorrufen. Die an der Darmschleimhaut entstehenden histopathologisch nachweisbaren Veränderungen werden als Attaching-and-effacing-Läsionen bezeichnet (KNUTTON et al., 1989; KENNY et al., 1997).

Das für die Intimine kodierende *E. coli*-attaching-and-effacing - Gen (*eae*) konnte aus insgesamt 43,8% der Proben amplifiziert werden. Attaching and effacing *E. coli* (AEEC) wurden bisher im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen bei Hunden, Kälbern, Ferkeln und Lämmern nachgewiesen (JANKE et al. 1989). In den eigenen

Untersuchungen war ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *eae* - Genen und dem Auftreten von Durchfall nicht festzustellen. In Proben durchfallkranker und gesunder adulter Hunde kamen *eae* -Gene etwa gleich häufig vor (35,1% bzw. 34,6%), Proben durchfallkranker und gesunder Jungtiere waren zu 50,0% bzw. 63,2% *eae* - positiv.

In humanen Stuhlproben ist die Prävalenz von *eae* - Genen insgesamt deutlich niedriger, jedoch konnten sie in Stuhlproben von Durchfallpatienten ebenfalls in etwa gleicher Häufigkeit nachgewiesen werden wie in Proben gesunder Probanden (2,9% bzw. 2,5%). Bei der genotypischen Charakterisierung der humanen *E. coli* - Isolate zeigte sich, daß die Stämme von Durchfallpatienten im Gegensatz zu den Stämmen von gesunden Probanden neben *eae* - Genen weitere Virulenzfaktoren wie *stx* - Gene oder Sequenzen des EPEC-adhärenz-factor- Plasmids (EAF) besaßen. Sie konnten damit den EHEC bzw. EPEC zugeordnet werden (SCHMIDT et al., 1994).

Canine AEEC - Stämme, die von Hunden mit Attaching-and-effacing - Läsionen isoliert worden waren besaßen ebenfalls Gensequenzen des EAF- Plasmid, sowie *bfp* - Gene und wiesen somit ein den humanen EPEC vergleichbares Virulenzmuster auf. *Stx* - Gene waren bei caninen AEEC jedoch nicht nachzuweisen (DROLET et al. 1994; BEAUDRY et al. 1996). Umgekehrt besaßen die in den eigenen Untersuchungen isolierten Shigatoxin-bildenden *E. coli*- Stämme keine *eae*- Gene. Folglich kann angenommen werden, daß Shigatoxinbildung und Intiminbildung bei caninen *E. coli* - Isolaten im Gegensatz zu humanen *E. coli*- Stämmen nicht oder nur sehr selten gemeinsam vorkommen.

Die Intimine humaner *E. coli*- Stämme können in vier Subtypen eingeteilt werden, wobei zwischen den einzelnen Typen Virulenzunterschiede zu bestehen scheinen (ADU-BOBIE et al., 1998). Für canine AEEC- Stämme könnte ähnliches gelten. Vermutlich ist die Intiminbildung aber ähnlich wie beim Menschen als alleiniges Virulenzmerkmal nicht ausreichend, um Durchfall beim Hund auszulösen.

Die antibiotische oder chemotherapeutische Therapie durchfallkranker Hunde hatte keinen Einfluß auf die Nachweishäufigkeit der *eae* - Gene. Proben vorbehandelter Hunde waren zu 39,0% *eae*- positiv und Proben nicht vorbehandelter Hunde zu

Besprechung der Ergebnisse

42,2%. Ebenso konnte keine Beziehung zu bestimmten Futtermitteln festgestellt werden.

Die Shigatoxinbildung gilt als das wichtigste Virulenzmerkmal der EHEC, jedoch handelt es sich bei den EHEC nur um eine relativ kleine Fraktion innerhalb der großen Gruppe der Shigatoxin - bildenden *E. coli* (STEC), so daß die Bezeichnung EHEC definitionsgemäß den STEC vorbehalten bleiben soll, die beim Menschen Krankheiten hervorrufen (BEUTIN et al., 1994).

Shigatoxingene (*stx*), wurden in 7,0% der 372 Proben nachgewiesen. Proben durchfallkranker Hunden waren zu 6,5% *stx* - positiv und Proben klinisch gesunder Hunde zu 8,3%. In vergleichbaren Untersuchungen konnten STEC bei 2,9% von 245 durchfallkranken Hunden (KRAMPE, 1995) und bei 4,8% von 63 gesunden Hunden nachgewiesen werden (BEUTIN et al., 1993). Die eigenen ermittelten Nachweisraten lagen höher als die Werte der beiden anderen Untersuchungen, da neben den von BEUTIN et al. und KRAMPE nachgewiesenen *stx1*- und *stx2*- Genen auch die inzwischen bekannten Gene *stx2c*, *stx2d* und *stx2e* erfaßt wurden. Die insgesamt relativ niedrige Prävalenz von STEC bei Hunden wird aber in allen 3 Untersuchungen deutlich. Mit vergleichbar niedriger Prävalenz konnten STEC aus Kotproben anderer Tierarten wie z.B. Schweinen, Katzen und Pferden isoliert werden. (BEUTIN et al. 1993, TREVENA et al. 1996). Im Gegensatz dazu wurden bei Schafen und Ziegen Ausscheiderraten von 60-70% bestimmt (BEUTIN et al. 1993). Bei landwirtschaftlich genutzten Rindern, die als Erregerreservoir für EHEC gelten, konnten STEC weltweit in über 50% der Kotproben nachgewiesen werden. (BALJER et. WIELER 1999).

Vom Menschen ist bekannt, daß EHEC- Infektionen in den meisten Fällen auf kontaminierte unzureichend erhitzte Nahrungsmittel zurückzuführen sind, wobei hier in erster Linie vom Rind stammende Lebensmittel wie Rinderhackfleisch, Hamburger oder unpasteurisierte Milch als Gefahrenquelle gelten (BELL et al. 1994). In den eigenen Untersuchungen waren *stx* - Gene besonders häufig bei Hunden nachzuweisen, deren Futterangebot auch Küchenreste und rohes Fleisch enthielt. Hier lag

der Anteil der *stx* - Ausscheider bei 19,0% bzw. 33,3% gegenüber 6,0% bei Hunden, die ausschließlich mit Dosen- oder Trockenfutter gefüttert wurden.

Eine chemotherapeutische oder antibiotische Vorbehandlung hatte keinen Einfluß auf die Nachweishäufigkeit von *stx*- Genen. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang aber, daß die Shigatoxinbildung durch die Verabreichung von Antibiotika oder Chemotherapeutika induziert werden kann, so daß EHEC-Patienten in der Humanmedizin in erster Linie symptomatisch behandelt werden (GILLIGAN, 1999).

EHEC sind als Erreger der hämorrhagischen Colitis (HC) beschrieben. In Deutschland werden sie für etwa 5% der Durchfallerkrankungen beim Menschen verantwortlich gemacht (KARCH et al., 1997). Die besondere Bedeutung dieser Erreger ist aber vor allem darin zu sehen, daß sie insbesondere bei Kindern unter 5 Jahren postenteritische Komplikationen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auslösen können, das in etwa 10% der Fälle zum Tod des Patienten führt (BOCKEMÜHL und KARCH 1996). Bei Tieren verlaufen STEC - Infektionen meistens inapparent. In Einzelfällen wurden wäßrige bis blutige Durchfälle bei Ferkeln und Kälbern beschrieben (CRAY et MOON, 1995; DEAN-NYSTROM et al., 1997). Bei Hunden wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von blutigem Durchfall und dem Nachweis von STEC - Bakterien vermutet (KRAMPE, 1995), was in den eigenen Untersuchungen in dieser Form jedoch nicht bestätigt werden konnte. *Stx*-Gene waren sowohl insgesamt, als auch in der Gruppe der adulten Hunde bei gesunden Tieren (8,3% bzw. 7,7%) häufiger nachzuweisen, als bei durchfallkranken (6,5% bzw. 2,6%) und erfüllten damit in ihrer Gesamtheit nicht die definierten Kriterien für Durchfallerreger. Da es sich bei den STEC jedoch um eine relativ heterogene Gruppe von *E. coli* - Bakterien handelt, ist hier sicher eine differenzierte Betrachtungsweise sinnvoll.

Aus humanmedizinischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Virulenz von EHEC-Stämmen in Abhängigkeit vom Vorhandensein weiterer Virulenzmerkmale stark variiert. So besitzen hochvirulente EHEC - Stämme in der Regel das *eae* - Gen, während es bei weniger virulenten Stämmen fehlen kann (BEUTIN et al., 1995). Außerdem konnte sowohl im Verozellzytotoxizitätstest, wie auch im Mausmodell gezeigt

Besprechung der Ergebnisse

werden, daß zwischen verschiedenen Shigatoxinvarianten in Abhängigkeit vom Testsystem zum Teil erhebliche Virulenzunterschiede bestehen (HEAD et al., 1988; TESH et al., 1993).

In den eigenen Untersuchungen konnte in Einzelfällen durchaus ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Durchfall und dem Nachweis von STEC - Bakterien vermutet werden. Insgesamt waren in 17 Proben durchfallkranker Hunde *stx* - Gene nachzuweisen. 9 Tiere waren mit Enteroparasiten oder Salmonellen befallen. Bei den verbleibenden 8 Hunden, 2 adulten und 6 jungen Tieren, konnten keine anderen Durchfallerreger nachgewiesen werden. Die beiden adulten Hunde zeigten eine erhöhte Anzahl Kotentleerungen, Flatulenz und Meteorismus. Die Jungtiere hatten in zwei Fällen schleimigen, in einem Fall blutigen und in einem weiteren Fall blutigen und schleimigen Durchfall. Bei diesen Tieren könnten die Durchfallsymptome möglicherweise durch die STEC - Infektion hervorgerufen worden sein.

Zum Nachweis der Shigatoxingene waren drei verschiedene Primerpaare eingesetzt worden. Primerpaar1 erfaßte das kodierende Gen für die B-Untereinheiten von Stx1. Primerpaar2 und 3 erfaßten kodierende Gene für die B-Untereinheiten von Stx2 und Stx2c, bzw. für die A-Untereinheiten von Stx2, Stx2c Stx2d und Stx2e. Da *stx1* lediglich in 3 Proben nachgewiesen wurde und zwischen den einzelnen Varianten von *stx2* nicht differenziert worden war, konnten mögliche Virulenzunterschiede der einzelnen Toxinvarianten nicht beurteilt werden.

Interessant ist jedoch, daß in 4 von 6 Proben aus denen Gensequenzen amplifiziert worden waren, die für die B- Untereinheiten der Toxine Stx2 bzw. Stx2c kodieren, die entsprechenden für die A- Untereinheiten dieser Toxine kodierenden Gene nicht erkannt wurden. Möglicherweise bilden canine STEC- Stämme Shigatoxinvarianten, die den bisher bekannten ähnlich, aber nicht mit diesen identisch sind und deshalb von den verwendeten Primern nicht übereinstimmend erkannt wurden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant die amplifizierten Genprodukte der *stx* - positiven Proben zu sequenzieren. Vielleicht handelt es sich hier um bisher noch nicht bekannte Varianten von *stx2*.

Die Ergebnisse des Shigatoxinnachweises mittels EIA können in ähnlicher Weise interpretiert werden. Untersucht wurden zunächst alle 372 Proben, wobei in keiner der Proben Shigatoxinbildung nachgewiesen werden konnte, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß als Ausgangsmaterial für die Keimanreicherung nach Angaben des Herstellers die bei -20°C aufbewahrten Kotproben verwendet wurden, wobei die tiefen Lagerungstemperaturen wahrscheinlich zum Absterben der STEC - Stämme geführt hatten. In einem zweiten Versuchsansatz wurden in Glycerin konservierte Enterobacteriaceen, die unmittelbar nach der Probengewinnung aus den Kotproben kultiviert worden waren als Ausgangsmaterial verwendet. Untersucht wurden 9 in der PCR *stx* - positive Proben. Hier konnte in 3 Proben Shigatoxinbildung nachgewiesen werden. In den übrigen 6 Proben wurden die Genprodukte entweder nicht exprimiert, oder es wurden Shigatoxinvarianten gebildet, die durch den EIA nicht erkannt wurden.

Isolierte Stämme

Die Isolierung eines EAEC - Stamms gelang aus einer der beiden *eagg* - positiven Proben. Aus den 26 *stx* - positiven Proben konnten insgesamt nur 7 STEC - Stämme isoliert werden. KRAMPE (1995) berichtet von ähnlichen Problemen. Er konnte mittels Verozell - Zytotoxizitätstest 13 verotoxinbildende *E. coli*- Stämme identifizieren, in der Kolonienblot - Hybridisierung aber keine *stx*- Gene bei diesen Stämmen nachweisen. Zum Teil mag dies sicher darauf zurückzuführen sein, daß *E. coli* - Bakterien bei der Subkultivierung plasmid - und phagenkodierte Virulenzmerkmale verlieren können (KARCH et al., 1992). Jedoch kann dies ebenfalls ein weiterer Hinweis darauf sein, daß canine STEC wie bereits vermutet bisher nicht bekannte *stx* - Varianten besitzen, die durch die bei der Kolonienblot - Hybridisierung eingesetzten Gensonden nicht erkannt wurden. Für diese zweite Erklärungsmöglichkeit spricht neben den bereits diskutierten Beobachtungen, daß bei der Kolonienblot-

Besprechung der Ergebnisse

Hybridisierung teilweise extrem schwache unspezifische Banden zu erkennen waren, die in dieser Form bei humanen EHEC- Isolaten nicht festzustellen sind.

Alle isolierten STEC- Stämme bildeten im Verozell - Zytotoxizitätstest Verotoxine. Zwei Stämme, die von durchfallkranken Hunden isoliert worden waren produzierten außerdem das EHEC - Hämolysin. *Eae*- Gene waren dagegen bei keinem der STEC - Stämme nachzuweisen. Außerdem gehörte keiner zu einer bisher bekannten humanpathogenen Serovar, so daß es sich bei den isolierten STEC- wahrscheinlich nicht um EHEC- Stämme handelt.

In der Literatur sind bisher nur zwei Fälle dokumentiert, in denen aus Hundekot ein klassischer O157:H7 EHEC- Stamm isoliert werden konnte. In einem Fall sind keine weiteren Angaben bekannt (KHAKHRIA et al., 1990). Im andern Fall handelte es sich um einen auf einer Farm lebenden Hund, der anlässlich einer EHEC-Infektion eines einjährigen Jungen, der engen Kontakt zu diesem Hund hatte untersucht worden war. Kind und Hund waren mit dem selben EHEC -O157:H7 - Stamm infiziert. Da aber auch Kotproben von anderen auf dieser Farm lebenden Tieren diesen Stamm aufwiesen, konnte der Hund nicht eindeutig als Infektionsquelle identifiziert werden (TREVINA 1993).

Das Risiko für den Menschen, sich bei Hunden mit EHEC- Bakterien anzustecken kann deshalb als sehr gering beurteilt werden.

6 Zusammenfassung

Bianca Thamm

Untersuchungen zur Prävalenz und pathogenen Bedeutung enterohämorrhagischer, enteroaggregativer und enteroinvasiver *Escherichia coli* beim Hund

Enterohämorrhagische (EHEC), enteroaggregative (EAEC) und enteroinvasive (EIEC) *E. coli* sind als Krankheitserreger beim Menschen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, mit welcher Prävalenz diese Keime bei Hunden vorkommen und ob sie als Durchfallerreger klinische Relevanz für den Hund besitzen. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob Hunde eine mögliche Infektionsquelle für den Menschen darstellen.

Untersucht wurden 109 Kotproben klinisch gesunder und 263 Kotproben durchfallkranker Hunde. Von allen Hunden wurden Angaben zu Alter und Fütterung bzw. bei den durchfallkranken zusätzlich zur Art der Durchfallsymptome und zur bisherigen Therapie erfaßt. Die Proben wurden parasitologisch und mikrobiologisch untersucht, wobei Helminthen, Protozoen und Salmonellen in 10,2%, 13,2% bzw. 3,2% der Proben nachgewiesen werden konnten. Mittels PCR wurde das Probenmaterial auf die Anwesenheit folgender Virulenzgene von *E. coli* überprüft: Das Invasions- Gen *invas* der EIEC, das Adhärenz- Gen *eagg* der EAEC, sowie das Enterohämolysin- Gen *hlyA*, das Intimin- Gen *eaeA* und die Shigatoxin- Gene *stx1B*, *stx2B*, *stx2cB*, *stx2A*, *stx2cA*, *stx2eA* und *stx2dA* der EHEC. Der Shigatoxinnachweis (Stx) erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen EIA.

Zur Isolierung der EAEC- und der shigatoxinbildenden (STEC) *E. coli*- Stämme wurde die Kolonienblot- Hybridisierung mit Digoxigenin-11-dUTP markierten Sonden eingesetzt. Die genotypische Charakterisierung der isolierten Stämme erfolgte mittels PCR und Restriktionsenzymverdau. Die Bildung von Verotoxinen wur-

Zusammenfassung

de im Verozellzytotoxizitätstest überprüft. Der Nachweis der Enterohämolysinbildung und Sorbitfermentation erfolgte durch Kultivierung auf Blutagar mit 5% defibrinierten Schafererythrozyten bzw. auf SMAC- Agar.

Die erzielten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: *Invas* konnte in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. *Eagg* kam bei gesunden und durchfallkranken Hunden in jeweils einer Probe vor (0,9% bzw. 0,4%). Virulenzgene der EHEC waren bei Jungtieren häufiger nachzuweisen als bei adulten Hunden und ausgenommen *hlyA* bei gesunden häufiger als bei durchfallkranken. *HlyA*- positiv waren zwei Proben von gesunden und sieben Proben von durchfallkranken Hunden (1,8% bzw. 2,7%), wobei Hunde die antibiotisch/ chemotherapeutisch vorbehandelt waren *hlyA* mehr als doppelt so häufig aufwiesen, wie nicht vorbehandelte Hunde. *EaeA* konnte in nahezu der Hälfte aller Proben nachgewiesen werden (49,5% der Gesunden bzw. 41,4% der Durchfallkranken). Shigatoxin- Gene kamen bei neun gesunden und 17 durchfallkranken Hunden vor (8,3% bzw. 6,5%). Betroffen waren insbesondere Hunde, die rohes Fleisch als Futter erhielten.

Isoliert wurden ein EAEC- und sieben STEC- Stämme. Alle STEC-Stämme zeigten Sorbitfermentation und Verotoxinbildung, wobei aber nur drei durch den Shigatoxin-EIA angezeigt worden waren. Bei allen STEC- Stämmen konnten *stx2*- oder Varianten von *stx2*- Genen nachgewiesen werden. Ein Stamm besaß zusätzlich das *hlyA*- und ein weiterer das *hlyA*- und das *stx1B*- Gen. *EaeA*- Gene waren bei keinem der Stämme nachzuweisen. Ebenso gehörte keiner der Stämme zu einer bisher bekannten humanpathogenen Serovar.

Die Ergebnisse zeigen, daß EIEC bei Hunden nicht und EAEC nur selten vorkommen und deshalb als Durchfallerreger für den Hund keine oder nur eine unbedeutende Rolle spielen. STEC kommen bei durchfallkranken und gesunden Hunden vor. Ein Zusammenhang zu Durchfall konnte in Einzelfällen vermutet, aber nicht sicher belegt werden. Aufgrund des von den EHEC verschiedenen Virulenzmusters caniner STEC und der fehlenden bzw. nur geringen Prävalenz von EIEC und EAEC sind Hunde als Ansteckungsquelle für den Menschen von untergeordneter Bedeutung.

7 Summary

Bianca Thamm

Investigations on the Prevalence and Pathogenic Significance of Enterohemorrhagic, Enteroaggregative, and Enteroinvasive *Escherichia coli* in Dogs

Enterohemorrhagic (EHEC), enteroaggregative (EAEC), and enteroinvasive (EIEC) *Escherichia coli* are known pathogens of humans. The purpose of this study was to determine the prevalence of these bacteria as well as their clinical relevance as a cause of diarrhea in dogs. In addition, the possibility of dogs serving as a source of infection for humans was examined.

Fecal samples from 109 clinically healthy dogs and 263 dogs with diarrhea were tested. Data on the age and manner of feeding was collected for each dog, as well as the symptoms and previous therapy in those dogs with diarrhea. The samples were tested parasitologically and bacteriologically, whereby Helminths, Protozoa and Salmonella were found respectively in 10.2%, 13.2% and 3.2% of the samples. Then the samples were examined by PCR for the presence of the following *E. coli* virulence genes: the invasive gene *invas* of EIEC, the adherence gene *eagg* of EAEC, and the enterohemolysin gene *hlyA*, the intimin gene *eaeA*, and the shigatoxin genes *stx1B*, *stx2B*, *stx2cB*, *stx2A*, *stx2cA*, *stx2eA*, and *stx2dA* of EHEC. Shigatoxin was demonstrated using a commercially available EIA.

In order to isolate EAEC and shigatoxin-producing (STEC) *E. coli* strains, a colony blot hybridization with digoxigenin-11-dUTP - marked gene probes was used. The genotypic characterization of the isolated strains was performed using PCR and restriction enzyme digestion. The formation of verotoxins was checked with the Verocell cytotoxicity test. Enterohemolysin production and sorbitol fermentation were

Summary

demonstrated by cultivation on blood agar with 5% defibrinated sheep erythrocytes resp. SMAC agar.

The results obtained can be summarized as follows: *Invas* was not found in any of the samples tested. *Eagg* was found in a single sample each from the healthy and the sick dogs (0.9% resp. 0.4%). Virulence genes of the EHEC were demonstrated more often in young dogs than in adults, and with the exception of *hlyA*, more often in healthy dogs than in those with diarrhea. Two samples from healthy dogs and seven from sick dogs (1.8% resp. 2.7%) were *hlyA*-positive, whereby it was over twice as common in those dogs which had been previously treated with antibiotics or chemotherapeutics than in those which had not been treated. *EaeA* was found in nearly half of all the samples (49.5% of the samples from healthy dogs and 41.1% of those from dogs with diarrhea). Shigatoxin genes were found in samples from nine healthy dogs and from 17 dogs with diarrhea (8.3% resp. 6.5%). Dogs fed raw meat were especially affected.

One EAEC and seven STEC strains were isolated. All of the STEC strains fermented sorbitol and produced verotoxin, whereas only three produced shigatoxin, as shown by EIA. *Stx2* genes or variants thereof were shown in all STEC strains. One strain also had the *hlyA* gene and another strain also had *hlyA* and *stx1B* genes. *Eae* genes was not found in any of the strains. None of the strains found belonging to known pathogenic serovars of man.

The results show that EIEC are not found in dogs and that EAEC are rare. Therefore it can be said that these bacteria only play a minor role as cause of diarrhea in dogs. STEC are found in dogs with diarrhea as well as in healthy dogs. A relationship to diarrhea could be presumed in some cases, but not proven. Because of the differing virulence patterns of EHEC and canine STEC and the absence resp. low prevalence of EIEC and EAEC, it can be concluded that the dog is of little importance as a source of infection for humans.

8 Literaturverzeichnis

ACHESON, D.W.K., A. DONOHUE-ROLFE u. G.T. KEUSCH (1991):

The family of Shiga and Shiga-like toxins.

In: ALOUF J.E. and J.H. FREER (eds.): Sourcebook of bacterial protein toxins. Academic Press Ltd., London, United Kingdom, 415-433

ACKERS, M.L., B.E. MAHON, E. LEAHY, B. GOODE, T. DAMROW, P.S. HAYES, W.F. BIPP, D.H. RICE, T.J. BARRETT, L. HUTWAGNER, P.M. GRIFFIN u. L. SLUTSKER (1998):

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption.

J. Infect. Dis. 177, 1588-1593

ADU-BOBIE, J., G. FRANKEL, C. BAIN, A.G. GONCALVES, L.R. TRABULSI, G. DOUCE, S. KNUTTON u. G. DOUGAN (1998):

Detection of Intimins α , β , γ , and δ , four Intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens.

J. Clin. Microbiol. 36, 662-8

AHMED, S. u. M. DONAGHY (1998):

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Central Scotland.

In: KAPER J.B. and A.D. O'BRIAN (eds.): *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology, Washington D.C., 59-65

ALEKSIC', S. u. J. BOCKEMÜHL (1990):

Microbiology and epidemiology of Yersinia infections.

Immun. Infect. 18, 178-85

ALLERBERGER, F., D. ROSSBOTH, M.P. DIERICH, S. ALEKSIC, H. SCHMIDT u. H. KARCH (1996):

Prevalence and clinical manifestation of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* infections in Austrian children.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 545-50

Literaturverzeichnis

AMTSBERG, G. u. G. KIRPAL (1987):

Vorkommen von Salmonellen bei Hunden und Katzen in Nordwestdeutschland.
Collegium. Vet. 78, 45-51

ANONYMOUS (1996):

VTEC O157 infection in West Yorkshire associated with the consumption of raw milk.

Commun. Dis. Rep. Wkly. 6, 181

ARMSTRONG, G.L, J. HOLLINGSWORTH u. J.G. MORRIS JR (1996):

Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world.

Epidemiol. Rev. 18, 29-51

BÄUMLER, A.J., R.M. TSOLIS, F.A. BOWE u. F. HEFFRON (1997):

Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*.

Adv. Exp. Med. Biol. 412, 149-58

BALJER, G. u. L.H. WIELER (1999):

Tiere als Infektionsquelle für den Menschen - durch EHEC hervorgerufene Erkrankungen.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106, 309-72

BAUDRY, B., S.J. SAVARINO, P. VIAL, J.B. KAPER u. M.M. LEVINE (1990):

A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen.

J. Infec. Dis. 161, 1249-51

BAUER, C., A. TAUBERT u. C. HERMOSILLA (1999):

Efficacy of two flubendazole against *Trichuris vulpis* in naturally infected dogs.

Vet. Rec. 145, 48

BEAUDRY, M., C. ZHU, J.M. FAIRBROTHER u. J. HAREL (1996):

Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions.

J. Clin. Microbiol. 34,144-8

BELL, B.P., M. GOLDOFT, P.M. GRIFFIN, M.A. DAVIS, D.C. GORDON, P.I. TARR, C.A. BARTLESON u. J.H. LEWIS (1994):

A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7- associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers.

J. Am. Med. Ass. 272, 1349-53

BELONGIA, E.A., M.T. OSTERHOLM, J.T. SOLER, D.A. AMMEND, J.E. BRAUN u. K.L. MAC DONALD (1993):

Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesotas child day-care facilities.

J. Am. Med. Ass. 269, 883-8

BENGER, A., R.P. RENNIE, J.T. ROBERTS, J.H. THORNLEY u. T. SCHOLTEN (1981):

A human coenurus infection in Canada.

Am. J. Trop. Hyg. 30, 638-44

BENJAMIN, M.M. u. A.R. DATA (1995):

Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

Appl. Environm. Microbiol. 61, 1669-72

BESSER, R.E., S.M. LETT, J.T. WEBER, M.P. DOYLE, T.J. BARRETT, J.G. WELLS u. P.M. GRIFFIN (1993):

An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cidre.

J. Am. Med. Ass. 269, 2217-20

BETTELHEIM, K. (1998):

Serotypes of non-O157 STEC isolated from humans.

In: Report of a WHO scientific working group meeting on zoonotic non-O157 Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) , Berlin, Germany 23-26 June 1998

BEUTIN, L. (1990):

Die Bedeutung und Erkennung von *Escherichia coli* als Krankheitserreger beim Menschen.

Bundesgesundheitsblatt 9/90, 380-6

BEUTIN, L., D. GEIER, H. STEINBRÜCK, S. ZIMMERMANN u. 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, 2483-8

BEUTIN, L., D. GEIER, S. ZIMMERMANN u. H. KARCH (1995):

Virulence markers of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species.

J. Clin. Microbiol. 33, 631-5

BEUTIN, L., L. BODE, M. OZEL u. R. STEPHAN (1990):

Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* O serogroup 26 strains.

J. Bacteriol. 172, 6469-75

BEUTIN, L., M.A. MONTENEGRO, I. ØRSKOV, F. ØRSKOV, J. PRADA, S. ZIMMERMANN u. R. STEPHAN (1989):

Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*.

J. Clin. Microbiol. 27, 2559-64

BEUTIN, L., S. ALEKSIC, J. BOCKEMÜHL, A. SCHWARZKOPF u. H. KARCH (1994):

Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993.

Bundesgesundheitsblatt 10, Sonderdruck, 410-14

BEUTIN, L. u. U. NIEMER (1995):

Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC).

Bundesgesundheitsblatt 11, Sonderdruck, 420-7

BIELASZEWSKA, M., J. JANDA, K. BLAHOVA, J. FEBER, V. POTUZNÍK u. A. SOUCKOVA (1996):

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in children with hemolytic uremic syndrome in the Czech Republic.

Clin. Nephrol. 46, 42-4

BISPING, W. u. G. AMTSBERG (1988):

Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

BITZAN, M., D.E. MÜLLER-WIEFEL, H. KARCH u. J. HEESEMANN (1992):

Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), Enterohämorrhagische *Escherichia coli* O157 als häufigste Erreger.

Dt. Ärztebl. 98 1183-6

BITZAN, M., K. LUDWIG, M. KLEMT, H. KÖNIG, J. BUREN u. D.E. MÜLLER-WIEFEL (1993):

The role of *Escherichia coli* O157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: Results of a Central European, multicentre study.

Epidemiol. Infect. 110, 183-96

BOCKEMÜHL, J., H. KARCH, H. RÜSSEMANN, S. ALEKSIC, R. WISS u. P. EMMERICH (1990):

Shiga-like Toxin (Verotoxin) produzierende *Escherichia coli* O22:H8, Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung an hämolytisch-urämischem Syndrom.

Bundesgesundheitsblatt 33/1, 3-6

BOCKEMÜHL, J. u. H. KARCH (1996):

Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995).

Bundesgesundheitsblatt 8/96, 290-6

BOCKEMÜHL, J., H. KARCH u. H. TSCHÄPE (1997):

Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996.

Bundesgesundheitsblatt 6/97, 194-7

BRANDSTETTER, W. u. H. AUER (1994):

Dipylidium caninum, ein seltener Parasit beim Menschen.

Wien. Klein. Wochenschr. 106, 115-6

BREWSTER, D.H., M.I. BROWN, D. ROBERTSON, G.L. HOUGHTON, J. BIMSON u. J.C. SHARP (1994):

An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling-pool.
Epidemiol. Infect. 112, 441-7

BURNENS, A.P., P. BOSS, F. ØRSKOV, I. ØRSKOV, U.B. SCHAAD, F. MULLER, R. HEINZLE u. J. NICOLET (1992):

Occurrence and phenotypic properties of verotoxin-producing *Escherichia coli* in sporadic cases of gastroenteritis.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11, 631-4

BURROWS, C.F. (1983):

Chronic diarrhea in the dog.
Vet. Clin. North. Am. 13, 521

CDC (1996):

Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice - British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996.
Morb. Mortal. Wkly. Rep. 45, 975

COBELJIC, M., Z. LEPSANOVIC u. S. VELIMIROVIC (1995):

Infrequent finding of verotoxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stools in Belgrade, Serbia.
Scand. J. Infect. Dis. 27, 427-8

COLLINSON, S.K., P.C. DOIG, J.L. DORAN, S. CLOUTHIER, T.J. TRUST u. W.W. KAY (1993):

Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin.
J. Bacteriol. 175, 12-18

COWDEN, J.M. u. P. CHRISTIE (1997):

Scottish outbreak of *Escherichia coli* O157.
Health. Bull. Edinb. 55, 9-10

CRAY, W.C. JR. u. H.W. MOON (1995):

Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7.
Appl. Environ. Microbiol. 61, 1586 - 90

CRYAN, B. (1990):

Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin.

J. Clin. Microbiol. 28, 792

DE GRANDIS, S., H. LAW, J. BRUNTON, C. GYLES u. C.A. LINGWOOD (1989):

Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin.

J. Biol. Chem. 264, 12520-5

DEAN, A.G., Y.C. CHING u. R.G. WILLIAMS (1972):

Test for *Escherichia coli* enterotoxins using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu.

J. Infect. Dis. 125, 407

DEAN-NYSTROM, E.A., B.T. BOSWORTH, W.C. CRAY JR. u. H.W. MOON (1997):

Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves.

Infect. Immun. 65, 1842- 8

DECLUDT, B., P. BOUVET, P. MARIANI, F. GRIMONT, P.A.D. GRIMONT, B. HUBERT u. C. LOIRAT (1997):

Hemolytic uremic syndrome and verotoxin-producing *Escherichia coli* infection in France.

In: VTEC 97: 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin) -producing *Escherichia coli* Infections 184/1, 21

DEPLAZES, P. u. J. ECKERT (1988):

The infection of dogs with *Taenia hydatigena*.

Schweiz. Arch. Tierheilkd. 130, 289-306

DIETRICH, A., H. AUER, M. TITTL u. T. BARISANI-ASENBAUER (1998):

Okulare Toxokariosis in Österreich.

Dtsch. Med. Wochenschr. 123,626-30

DIEZ-GONZALEZ, F., T.R. CALLAWAY, M.G. KIZOULIS u. J.B. RUSSEL (1998):

Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle.

Science 281,1666-8

DONTA, S.T, H.W. MOON u. S.C. WHIPP (1974):

Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxins with the use of adrenal cells in tissue culture.

Science 183, 334

DRESAR, B.S. u. M.J. HILL (1974):

Human Intestinal Flora.

Academic Press, London 36-43

DROLET, R., J.M. FAIRBROTHER, J. HAREL u. P. HÉLIE (1994):

Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog.

Can. J. Vet. Res. 58, 87-92

DUPONT, J.L., S.B. FORMAL, R.B. HORNICK, M.J. SNYDER, J.P. LIBONATI, D.G. SHEAHAN, E.H. LABREC u. J.P. KALAS (1971):

Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea.

N. Engl. J. Med. 285, 1-9

ECKERT, J. (1997):

Epidemiology of Echinococcus multilocularis and Echinococcus granulosus in central Europe.

Parasitologia 39, 337-44

EDELMAN, R., M.A. KARMALI u. P.A. FLEMING (1988):

Summary of the international symposium and workshop on infections due to Verocytotoxin (Shiga-like toxin)- producing *Escherichia coli*.

J. Infect. Dis. 157, 1102-4

EPE, C., K. ROESLER, T. SCHNIEDER u. M. STOYE (1999):

Untersuchungen zur Prävention von neonatalen *Ancylostoma caninum* - Infektionen bei Welpen durch Verabreichung von Moxidectin an die Mutterhündin.

Zentralbl. Veterinärmed. [B] 46, 361-7

EPE, C., S. ISING-VOLMER u. M. STOYE (1993):

Parasitologische Kotuntersuchungen von Pferden, Hunden, Katzen und Igel während der Jahre 1984-1991.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 100, 426-8

ESLAVA, C., J. VILLASECA, R. MORALES, A. NAVARRO u. A. CRAVIOTO (1993):
Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative
Escherichia coli.

In: Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology,
Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, Abstr. B-105, 44

FARSTADT, L., T. LANDSVERK u. J. LASSEN (1976):

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from a dog with chronic enteritis. A case report.
Acta Vet. Scand. 17, 261

FINLAY, B.B., S. RUSCHKOWSKI u. S. DEDHAR (1991):

Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells.
J. Cell. Sci. 99, 283-96

FRANKEL, G., L. RILEY, J.A. GIRON, J. VALMASSOI, A. FRIEDMANN, N.
STOCKBINE, S. FALKOW u. G.K. SCHOOLNIK (1990):

Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification.
J. Infec. Dis. 161, 1252-6

FUKUSHIMA, H., R. NAKAMURA, S. IITSUKA, M. TSUBOKURA, K. OTSUKI u. Y.
KAWAOKA (1984):

Prospective systematic study of *Yersinia* spp. in dogs.
J. Clin. Microbiol. 19, 616-22

FUKUSHIMA, K. u. R.G. HELMAN (1984):

Cryptosporidiosis in a pup with distemper.
Vet. Pathol. 21, 247-8

GALÁN, J.E. u. R. CURTISS III (1989):

Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella*
typhimurium to penetrate tissue culture cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6383-7

GALLIEN, O., H. KLIE, S. LEHMANN, D. PROTZ, R. HELMUTH, R. SCHAEFER u.
M. EHRLER (1994):

Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftli-
chen Nutztieren in Sachsen-Anhalt.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 107, 331-4

GIANELLA, R.A., R.E. GOTS, A.N. CHARNEY, W.B. GREENOUGH u. S.B. FORMAL (1975):

Pathogenesis of Salmonella - mediated intestinal fluid secretion: activation of adenylate cyclase and inhibition by indomethacin.

Gastroenterology 69, 1238-45

GIANELLA, R.A., S.B. FORMAL, G.J. DAMMIN u. H. COLLINS (1973):

Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum.

J. Clin. Investig. 52, 441-53

GILLIGAN, P.H. (1999)

Escherichia coli, EAEC, EHEC, EIEC, ETEC.

Clin. Lab. Med. 19, 505-21

GÓMEZ-DUARTE, O.G. u. J.B. KAPER (1995):

A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 63, 1767-76

GOTHE, R. u. I. REICHLER (1990):

Enteroparasitenarten und Infektionshäufigkeit bei Hündinnen und ihren Welpen in Süddeutschland.

Tierärztl. Praxis. 18, 61-4

GRIFFIN, P.M u. 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

GYLES, C.L. (1994):

Escherichia coli enterotoxins

In: GYLES C.L. (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, CAB International, Wallingford, 365-89

HACKETT, J., P. WYK, P. REEVES u. V. MATHAN (1987):

Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid.

J. Infec. Dis. 155, 540-9

HAHN, N.E., C.A. GKASER, D.W. HIRD u. D.C. HIRSH (1988):

Prevalence of *Giardia* in the feces of pups.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 192, 1428-9

HALE, T.L. (1991)::

Genetic basis of virulence in *Shigella* species.

Microbiol. Rev. 55, 206-24

HAMMERMUELLER, J., S. KRUTH, J. PRESCOTT u. C. GYLES (1995):

Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea.

Can. J. Vet. Res. 59, 265-70

HAREL, Y., M. SILVA, B. GIROIR, A. WEINBERG, T.B. CLEARY u. B. BEUTLER (1993):

A reporter transgene indicates reanal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin.

J. Clin. Invest. 92, 2110-16

HARRIS, J.R., I.K. WACHSMUTH, B.R. DAVIS u. M.L. COHEN (1982):

High molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness.

Infect. Immun. 37, 1295-1298

HARTUNG, M. u. R. HELMUTH (1998):

Salmonella - Teil 1: Epidemiologische Situation bei Tieren, Lebens- und Futtermitteln. BgVV-Hefte 12/97, 15-24

HEAD, S.C., M. PETRIC, S.E. RICHARDSON, M.E. ROSCOE u. M.A. KARMALI (1988):

Purification and characterization of Verocytotoxin2.

FEMS Microbiol. Lett. 51, 211-6

HEESEMANN, J. (1990):

Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden.

Immun. Infekt. 6, 186-98

HEESEMANN, J. u. H. KARCH (1995):

Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC).

Internist 36, 102-5

HELMUTH, R., M.A. MONTENEGRO, A. STEINBECK u. O. PIETZSCH (1990):

Molekularbiologische Methoden der epidemiologischen Feincharakterisierung von Krankheitserregern am Beispiel von Salmonella enteritidis aus Geflügel. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 103, 416-21

HENDRIX, C.M., H.S. BRUCE, N.J. KELLMANN, G. HARRELSON u. B.F. BRUHN (1996):

Cutaneous larva migrans and enteric hookworm infections.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 209, 1763-7

HEWLETT, E.L., J.S. ANDREWS JR., J. RUFFIER u. F.W. SCHAEFER (1982):

Experimental infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites.

J. Infec. Dis. 145, 89-93

HOPKINS, R.M., B.P. MELONI, D.M. GROTH, J.D. WETHERALL, J.A. REYNOLDS u. G.C. THOMPSON (1997):

Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality.

J. Parasitol. 83, 44-51

HULL, A.E., D.W. ACHESON, P. ECHEVERRIA, A. DONOHUE ROLFE u. G.T. KEUSCH (1993):

Mitomycin immunoblot colony assay for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: Comparison with DNA probes.

J. Clin. Microbiol. 31, 1167-72

HUPPERTZ, H.I., D. BUSCH, H. SCHMIDT, S. ALEKSIC u. H. KARCH (1996):
Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-157 organisms that produce Shiga-like toxin.

J. Pediatr. 128, 341-46

HUPPERTZ, H.I., S. RUTKOWSKI, S. ALEKSIC u. H. KARCH (1997)::
Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe.

Lancet 349, 1660-2

ISOGAI, E., H. ISOGAI, K. KIMURA, S. HAYASHI, T. KUBOTA, N. FUJII u. K. TAKESHI (1998):

Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain.

Infect. Immun. 66, 197-202

JACKSON, M.P. (1990):

Structure-function analyses of Shiga toxin and the Shiga-like toxins.

Microb. Pathogenesis 8, 235-42

JACKSON, S.G., R.B. GOODBRAND, R.P. JOHNSON, V. GODORICO, D. ALVES, K. RAHN, J.B. WILSON, M.K WELCH u. R. KHAKHRIA (1998):

Escherichia coli O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm.

Epidemiol. Infect. 120, 17-20

JANKE, B.H., D.H. FRANCIS, J.E. COLLINS, M.C. LIBAL, D.H. ZEMAN u. D.D. JOHNSON (1989):

Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs.

J. Vet. Diagn. Invest. 1,6-11

JARVIS, K.G., J.A. GIRON, A.E. JERSE, T.K. MC DANIEL, M.S. DONNENBERG u. J.B. KAPER (1995):

Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7996-8000

JOHNSON, R.P., R.C. CLARKE, J.B. WILSON u. E.T. AL (1996):

Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxin-producing *Escherichia coli*.

J. Food. Prot. 59, 1112-22

JOHNSON, W.M., H. LIOR u. G.S. BEZANSON (1983):

Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada.

Lancet I, 76

JONES, B.D., N. GHORI u. S. FALKOW (1994):

Salmonella typhimurium initiates murine by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches.

J. Exp. Med. 180, 15-23

JONES, J.G., M. ROWORTH (1996):

An outbreak of *Escherichia coli* O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply.

Public Health 110, 277-82

KAPER, J.B. (1996):

Defining EPEC.

Rev. Microbiol. 27,130-3

KARCH, H., C. JANETZKI-MITTMANN, S. ALEKSIC u. M. DATZ (1996):

Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic uremic syndrome using immunomagnetic separation, DNA-based methods and direct culture.

J. Clin. Microbiol. 34, 516-9

KARCH, H., H.I. HUPPERTZ, J. BOCKEMÜHL, H. SCHMIDT, A. SCHWARZKOPF u. R. LISSNER (1997):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany.

J. Food. Prot. 11, 1454-7

KARCH, H., N.A. STOCKBINE u. A.D. O'BRIAN (1986):

Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of Shiga-like toxin-producing strains by colony blot assay.

FEMS Microbiol. Lett. 35, 141-5

KARCH, H. u. T MEYER (1989a):

Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction.

J. Clin. Microbiol. 27, 2751-7

KARCH, H. u. T MEYER (1989b):

Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*.

J. Clin. Microbiol. 27, 1180-1186

KARMALI, M.A. (1989):

Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*.

Clin Microbiol. Rev. 2, 15-38

KARMALI, M.A., G.S. ARBUS, M. PETRIC, M.L. PATRICK, M. ROSCOE, J. SHAW u. H. LIOR (1988):

Hospital-acquired *Escherichia coli* O157:H7 associated haemolytic uraemic syndrome in a nurse.

Lancet 1, 526

KAUFFMANN, F. (1944):

Zur Serologie der *coli*-gruppe.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 21, 20-45

KAUFFMANN, F. (1947)

The serology of the *coli*-group.

J. Immunol. 57, 71-100

KAVI, J., I. CHANT, M. MARIS u. P.E. ROSE (1987):

Cytopathic effect of verotoxin on endothelial cells.

Lancet II, 1035

KEENE, W.E., E. SAZIE, J. KOK, D.H. RICE, D.D. HANCOCK, V.K. BALAN, T. ZHAO u. M.P. DOYLE (1997):

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat.

J. Am. Med. Ass. 277, 1229-31

KEENE, W.E., J.M. MCANULTY, F.C. HOESLY, L.P. WILLIAMS JR., K. HEDBERG, G.L. OXMAN, T.J. BARRETT, M.A. PFALLER u. D.W. FLEMING (1994):

A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*.

N. Engl. J. Med. 331, 579-84

KENNY, B., L.C. LAI, B.B. FINLAY u. M. S. DONNENBERG (1996):

EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), is required to induce signals in epithelial cells.

Mol. Microbiol. 20, 313-23

KENNY, B., R. DEVINNEY, M. STEIN, D.J. REINSHEID, E.A. FREY u. B.B. FINLAY (1997):

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adhesion into mammalian cells.

Cell 91, 511-29

KHAKHRIA, R., D. DUCK u. H. LIOR (1990):

Extended phagetyping scheme for *Escherichia coli* O157:H7.

Epidemiol. Infect. 105, 511-20

KIRKPATRICK, C.E. (1987):

Giardiasis.

Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 17, 1377-87

KNUTTON, S., T. BALDWIN, P.H. WILLIAMS u. A.S. MCNEISH (1989):

Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 57, 1290-8

KONOWALCHUK, J., J.L. SPEIRS u. S. STAVRIC (1977):

Verocell response to a cytotoxin of *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 18, 775-9

KRAMPE, C. (1995)

Nachweis sowie phäno- und genotypische Charakterisierung toxinbildender *E. coli*-Isolate aus Durchfallproben von Hunden und Katzen.

Gießen, Justus-Liebig-Universität, Diss.

KRESSE, A.U., K. SCHULZE, C. DEIBEL, F. EBEL, M. RHODE, T. CHAKRABORTY u. C.A. GUZMAN (1998):

Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 180, 4370-9

KUDVA, I.T., C.W. HUNT, C.J. WILLIAMS, U.M. NANCE u. C.J. HOVDE (1997):

Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep.

Appl. Environm. Microbiol. 63, 3878-86

LAW, D. (1994):

Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clin.

Microbiol. Rev. 7,152

LAW, D. u. H. CHART (1998):

Enteropathogenic *Escherichia coli*.

J. Appl. Microbiol. 84, 685-97

LEVINE, M.M. (1987):

Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent.

J. Infect. Dis. 155, 377-89

LIDDELL, K.G. (1997):

Escherichia coli O157: Outbreak in central Scotland.

Lancet 349, 502-3

LIN, J., M.P. SMITH, K.C. CHAPIN, H.S. BAIK, G.N. BENNETT u. J.W. FOSTER (1996):

Mechanism of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

Appl. Environm. Microbiol. 62, 3094-100

LOOS, M. u. T.M. WASSENAAR (1994):

Pathogenitätsfaktoren von enteritischen Salmonellen.

Immun. Infect. 22, 14-19

LUDWIG, K., H. RUDER, M. BITZAN, S. ZIMMERMANN u. H. KARCH (1997):
Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in a large family.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16, 238-41

MACKENZIE, A.M.R., P. LEBEL, E. ORRBINE, P.C. ROWE, L. HYDE, F. CHAN, W. JOHNSON, P.N. MCLAIN u. THE SYNSORB PK STUDY INVESTIGATORS (1998):
Sensitivities and specificities of Premier *E. coli* O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (shiga-like toxin) -producing *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. 36, 1608-11

MAGNAVAL, J.F., V. GALINDO, L.T. GLICKMAN u. M.C. LANET (1997):
Human Toxocara infection of the central nervous system and neurological disorders: a case-control study.
Parasitology 115, 537-43

MARCH, S.B. u. S. RATNAM (1986):
Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis.
J. Clin. Microbiol. 23, 869-72

MC WHORTER-MURLIN, A.C. u. F.W. HICKMANN-BRENNER (1994):
Identification and serotyping of Salmonella and an update of the Kauffmann-White scheme.
Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta

MC GOVERN, V.J. u. L.J. SLAVUTIN (1979):
Pathology of salmonella colitis.
Am. J. Surg. Pathol. 3, 483-90

MEHLHORN, H., D. DÜWEL u. W. RAETHER (1993):
Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

MEYER, H. (1999):
Tiere als Infektionsquelle für den Menschen - Salmonellose.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106, 344-51

MICHINO, H., H. ARAKI, S. MINAMI u. E.T. AL (1998):

Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan.

In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. KAPER J.B. and A.D. O'BRIAN (eds.) Washington D.C.: American Society for Microbiology, 73-81

MOON, H.W., S.C. WHIPP, R.A. ARGENZIO, M.M. LEVINE u. R.A. GIANELLA (1983):

Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestine.

Infect. Immun. 41, 1340-51

MORABITO, S., H. KARCH, P. MARIANI-KURKDJIAN, H. SCHMIDT, F. MINELLI, E. BINGEN u. A. CAPRIOLI (1998):

Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome.

J. Clin. Microbiol. 36, 840-2

MORGAN, D., C. NEWMAN u. S.R. PALMER (1988):

First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK.

Epidemiol. Infect. 101, 83-91

MOXLEY, R.A. u. DH FRANCIS (1986):

Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves.

Infect immun 53, 339-46

MULLIS, K.B. (1990):

Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion.

Spektrum der Wissenschaft, Juni 1990, 60-7

NATARO, J.P., Y. DENG, D.R. MANEVAL, A.L. GERMAN, W.C. MARTIN u. M.M. LEVINE (1992):

Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect. Immun.

60, 2297-2304

Literaturverzeichnis

NATARO, J.P., D. YIKANG, J.A. GIRON, S.J. SAVARINO, M.H. KOTHARY u. R. HALL (1993):

Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions.

Infect. Immun. 61, 1126-31

NATARO, J.P., J. SERIWATANA, A. FASANO, D.R. MANEVAL, L.D. GUERS, F. NORIEGA, F. DUBOVSKY, M.M. LEVINE u. J.G. MORRIS JR. (1995):

Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and Shigella strains.

Infect. Immun. 63, 4721-8

NATARO, J.P. u. J.B. KAPER (1998):

Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Clin Microbiol. Rev. 11, 142

NATARO, J.P. u. J.B. KAPER (1998):

Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201

NAVARRO-GARCÍA, F., C. ESLAVA, J.M. VILLASECA, R. LÓPEZ-REVILLA, J.R. CZECZULIN, S. SRINIVAS, J.P. NATARO u. A. CRAVIOTO (1998):

In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 66, 3149-54

NEAFIE, R.C. u. A.M. MARTY (1993):

Unusual infections in humans.

Clin. Microbiol. Rev. 6, 34-56

NETER, E., O. WESTPHAL, O. LUDERITZ u. E.A. GORZYNSKI (1955):

Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages.

J. Pediatr. 16, 801-7

NIEMAND, H.G. u. P.F. SUTER (1994):

Praktikum der Hundeklinik.

Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

ØRSKOV, F. u. I. ØRSKOV (1983):
Serology of *Escherichia coli* fimbriae.
Progress in Allergy 33, 80-105

ØRSKOV, F., I. ØRSKOV u. J.A. VILLAR (1987):
Cattle as reservoir of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7.
Lancet 2, 276

ØRSKOV, F. u. I. ØRSKOV (1985):
Escherichia coli in extraintestinal infections.
J. Hyg. 95, 551-7

O'BRIAN, A.D., G.D. LA VECK, M.R. THOMPSON u. S.B. FORMAL (1982):
Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*.
J. Infec. Dis. 146, 763-9

OLSON, O., A. HEDHAMMER, A. FARIS, K. KROVACEK u. T. WADSTROEM
(1985):
Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Klebsiella pneumoniae isolated from
dogs with diarrhoea.
Vet. Microbiol. 10, 577-89

ORR, P., D. MILLEY, D. COLBY u. M. FAST (1994):
Prolonged fecal excretion of Verotoxin-producing *Escherichia coli* following diarrheal
illness.
Clin. Inf. Dis. 19, 796-7

OVERGAAUW, P.A. (1997):
Aspects of Toxocara epidemiology: Toxocarosis in dogs and cats.
Crit. Rev. Microbiol. 23, 233-51

OVERGAAUW, P.A. u. J.H. BOERSEMA (1998):
Nematode infections in dog breeding kennels in the Netherlands, with special refe-
rence to Toxocara.
Vet. Q 20, 12-5

PAPAGEORGES, M., R. HIGGINS u. Y. GOSSELIN (1983):

Yersinia enterocolitica enteritis in two dogs.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 182, 618

PAUL, A., C. PERRIA, S. TURTAS, M. BRAMBILLA u. G. VIALE (1990):

Long-term follow-up of the surgical treatment of intracranial coenurosis.

Br. J. Neurosurg. 4, 39-43

PAVIA, A.T., C.R. NICHOLS, D.P. GREEN, R.V. TAUXE, S. MOTTICE, K.D. GREENE, J.G. WELLS, R.L. SIEGLER, E.D. BREWER, D. HANNON, ET AL. (1990): Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: Clinical and epidemiologic observations.

J. Pediatr. 116, 544-51

PERERA, L.P., L.R. MARQUES u. A.D. O'BIAN (1988):

Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbant assay.

J. Clin. Microbiol. 26, 2127-31

PHILLIPS, S.F. (1972):

Diarrhea: A current view of the pathophysiology.

Gastroenterology. 63, 495

PIÉRARD, D., D. STEVENS, L. MORIAU, H. LIOR u. S. LAUWERS (1997):

Isolation and virulence factors of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples.

Clin. Microbiol. Infect. 3, 531-40

PIÉRARD, D., L. MUYLDERMANS, L. MORIAU, D. STEVENS u. S. LAUWERS (1998):

Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates.

J. Clin. Microbiol. 36, 3317-22

POLLARD, D.R., W.M. JOHNSON, H. LIOR, S.D. TYLER u. K.R. ROZEE (1990):
Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction.

J. Clin. Microbiol. 28, 540-5

PROCIV, P. u. J. CROESE (1996):

Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a „new“ zoonosis.

Acta. Trop. 62, 23-44

RENNWICK, S.A., J.B. WILSON, R.C. CLARKE, H. LIOR, A.A. BORCZYK, J. SPIKA, K. RAHN, K. MC FADDEN, A. BROUWER, A. COPPS, ET AL. (1993):

Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human.

J. Infec. Dis. 168, 792-3

RICHTER, H., H. KLIE, M. TIMM, P. GALLIEN, H. STEINRUCK, K.W. PERLBERG . D. PROTZ (1997):

Verotoxinbildende *Escherichia coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 110, 121-7

RICHTER, T., S. GRUND u. E. HELLMANN (1984):

Zum Vorkommen von enterotoxischen *E. coli* beim Junghund. Beschreibung mutmaßlicher Pathogenitätsfaktoren.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 97, 37-43

RILEY, L.W., R.S. REMIS, S.D. HELGERSON, H.B. MCGEE, J.G. WELLS, B.R. DAVIS, R.J. HERBERT, E.S. OLCOTT, L.M. JOHNSON, N.T. HARGRETT, P.A. BLAKE u. M.L. COHEN (1983):

Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype.

N. Eng. J. Med. 308, 681-5

SACK, R.B., S.L. GORBACH, J.G. BANWELL, B. JACKOBS, B.D. CHATTERJEE u. R.C. MITRA (1971):

Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease.

J. Infect. Dis. 123, 378-85

SAVARINO, S.J., A. FASANO, D.C. ROBERTSON u. M.M. LEVINE (1991):
Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model.

J. Clin. Invest. 87, 1450-5

SAVARINO, S.J., A. FASANO, J. WATSON, B.M. MARTIN, M.M. LEVINE, S. GUANDALINI u. P. GUERRY (1993):

Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3093-7

SCHMIDT, H., C. KNOP, S. FRANKE, S. ALEKSIC, J. HEESEMANN u. H. KARCH (1995):

Development of PCR for Screening of enteroaggregative *Escherichia coli*.

J. Clin. Microbiol. 33, 701-5

SCHMIDT, H., H. RÜSSMANN, A. SCHWARZKOPF, S. ALEKSIC, J. HEESEMANN u. H. KARCH (1994):

Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls.

Zentralbl. Bakteriolog. 281, 201-13

SCHNIEDER, T., M. LECHLER, C. EPE, S. KUSCHFELDT u. M. STOYE (1996):

The efficacy of doramectin on arrested larvae of *Ancylostoma caninum* in early pregnancy of bitches.

Zentralbl. Veterinärmed. [B] 46, 361,7

SCOTLAND, S.M., H.R. SMITH, B. SAID, G.A. WILLSHAW, T. CHEASTY u. B. ROWE (1991):

Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching-and-effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence-factor probe.

J. Med. Microbiol. 35, 278-83

SCOTLAND, S.M., H.R. SMITH, G.A. WILLSHAW u. B. ROWE (1983):

Verocytotoxin-production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. Lancet II, 216

SELBITZ, H.-J. (1992):

Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie
Gustav-Fischer-Verlag Jena

SERENY, B. (1957):

Experimental keratoconjunctivitis shigellosa.
Acta Microbiol. Acad. Scient. Hung. 4, 367-76

SHAW, P.K., R.E. BRODSKY, D.O. LYMAN, B.T. WOOD, C.P. HIBLER, G.R. HEALY, K.I. MACLEOD, W. STAHL u. M.G. SCHULTZ (1977):

A communitywide outbreak of Giardiasis with evidence of transmission by a municipal water supply.

Ann. Intern. Med. 87, 426-32

SHERDING, R.G. u. C. F. BURROWS (1992):

Diarrhea

In: ANDERSON N.V. (ed.): Veterinary Gastroenterology, Lea und Febiger, Pennsylvania, 399-470

SHUKLA, R., R. SLACK, A. GEORGE, T. CHEASTY, B. ROWE u. J. SCUTTER (1995):

Escherichia coli O157 infection associated with a farm visitor centre

Commun. Dis. Rep. Rev. 5, R86-90

SMITH, H.W. u. J.E.T. JONES (1967):

Observations on experimental oral infection with *Salmonella dublin* in calves and *Salmonella choleraesuis* in pigs.

J. Pathol. Bacteriol. 93, 141-56

STINGL, P. (1982):

Ein Fall von *Larva migrans cutanea* in der Allgemeinpraxis.

Z. Hautkr. 57, 1444-6

SWERDLOW, D.L., B.A. WOODRUFF, R.C. BRADY, ET AL. (1992):

A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death.

Am. Intern. Med. 117, 812-9

Literaturverzeichnis

TARATUTO, A.L. U. S.M. VENTURIELLO (1997):

Echinococcosis.

Brain. Pathol. 7(1), 673-9

TARR, P.I. (1995):

Escherichia coli O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection.

Clin. Infect. Dis. 20, 1-10

TAYLOR, D.N., P. ECHEVERRIA, O. SETHABUTR, C. PITARANGSI, U. LEKSOMBOON, N.R. BLACKLOW, B. ROWE, R. GROSS U. J. CROSS (1988):

Clinical and microbiologic features of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization.

J. Clin. Microbiol. 26, 1362-6

TESH, V.L., J.A. BURRIS, J.W. OWENS, V.M. GORDON, E.A. WADOLKOWSKI, A. O'BRIAN u. J. SAMUEL (1993):

Comparison of relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice.

Infect. Immun. 61, 3392-3402

TOLEDO, M.R.F. u. L.R. TRABULSI (1983):

Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test.

J. Clin. Microbiol. 17, 419-21

TREVENA, W.B., R.S. HOOPER, C. WRAY, G.A. WILLSHAW, T. CHEASTY u. G. DOMINGUE (1996):

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals.

Vet. Rec. 138, 400

TZIPORI, S., J. MONTANARO, R.M. ROBINS-BROWNE, P. VIAL, R. GIBSON u. M.M. LEVINE (1992):

Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model.

Infect. Immun. 60, 5302-6

VIAL, P.A., R. ROBINS-BROWNE, H. LIOR, V. PRADO, J.B. KAPER, J.P. NATARO, D. MANEVAL, A. ELSAYED u. M.M. LEVINE (1988):

Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease.

J. Infec. Dis. 158, 70-9

WALLACE, J.S., T. CHEASTY u. B. ROWE (1997):

Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds.

J. Appl. Microbiol. 82, 399-404

WANG, G. u. M.P. DOYLE (1998):

Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water.

J. Food. Prot. 61, 662-7

WASTLHUBER, U., C. SPLEISS u. J.E. LOHR (1998):

Verotoxin production and adhesion genes of *Escherichia coli* -isolates from commercial poultry and psittacine birds - detection by PCR.

Tierärztl. Praxis. 26, 61-4

WATANABE, H., A. WADA, Y. INAGAKI, K. ITOH u. K. TAMURA (1996):

Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996.

Lancet 348, 831-2

WATANABE, Y. u. K.OZASA (1997):

An epidemiological study on an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection.

Rinsho. Byori. 45, 869-74

WEBER, A. (1983):

Welche Rolle spielen Heimtiere bei Salmonellenerkrankungen des Menschen?

Prakt. Tierarzt. 64, 820

WEBER, A., R. WACHOWITZ, U. WEIGL u. R SCHÄFER-SCHMIDT (1995):

Nachweishäufigkeit von Salmonellen in Kotproben von Hunden und Katzen in Nordbayern von 1975 bis 1994.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 108, 401-4

WEINSTEIN, D.L., M.P. JACKSON, J.E. SAMUEL, R.K. HOLMES u. A.D. O`BRIAN (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, 4223-30

WELLS, J.G., B.R. DAVIS, I.K. WACHSMUTH, L.W. RILEY, R.S. REMIS, R. SOKOLOW, G.K. MORRIS (1983):

Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype.

J. Clin. Microbiol. 18, 512-20

WELLS, J.G., SHIPMAN L.D., GREENE K.D., ET AL. (1991):

Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle.

J. Clin. Microbiol. 29, 985-989

WIELER, L.H., E. VIELER, C. ERPENSTEIN, T. SCHLAPP, H. STEINRÜCK, R. BAUERNFEIND, A. BYOMI u. G. BALJER (1996):

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from bovines: association of adhesion with the carriage of eae and other genes.

J. Clin. Microbiol. 34, 2980-4

WILSON, R.B., M.A. HOLSCHER, S.J. LYLES (1983):

Cryptosporidiosis in a pup.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 1005

WOLF, K.W. (1997):

Occurrence, distribution and associations of O- and H- serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*.

Clin. Microbiol. Rev. 10, 569-84

WOOD, P.K., J. GLENN MORRIS, P.L.C. SMALL, O. SETHABUTR, M.R.F. TOLEDO, L. TRABULSI u. J.B. KAPER (1986):

Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains.

J. Clin. Microbiol. 24, 498-500

WOOLEY, R.E., E.B. SCHOTT JR u. J.W. MCCONNELL (1980):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* from selected animal species.
Am. J. Vet. Res. 41, 1667-8

XIAO, L., U.M. MORGAN, J. LIMOR, A. ESCALANTE, M. ARROWOOD, W. SHULAW, R.C. THOMPSON, R. FAYER u. A.A. LAL (1999):
Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species.
Appl. Environ. Microbiol. 65, 3386-91

YAMAMOTO, T., N. WAKISAKA, F. SATO u. A. KATO (1997):
Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Lett. 147, 89-95

YANAGAWA, Y., T. MARUYAMA u. S. SAKAI (1978):
Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from apparently healthy dogs and cats.
Microbiol. Immunol. 22, 643

YOLKEN, R.H., H.B. GREENBERG u. M.H. MERSON (1977):
Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin.
J. Clin. Microbiol. 6, 439

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden als Vorträge auf folgenden Tagungen präsentiert:

- Enterohemorrhagic *E. coli* in dogs.

Referentin: B. Thamm

2nd Annual Conference of the European Society of Veterinary Internal Medicine

24. – 26. Sept. 1998 in Wien

- Enterohämorrhagische *E. coli* beim Hund.

Referentin: Dr. E. Müller

Bayerischer Tierärztetag, 13. - 16. Mai 1999 in München

und als Labor-Info: EHEC beim Hund, der Fa. Laboklin GmbH, Bad Kissingen veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation mit dem Titel:
Untersuchungen zur Prävalenz und pathogenen Bedeutung enterohämorrhagischer,
enteroaggregativer und enteroinvasiver *Escherichia coli* beim Hund
selbständig verfaßt habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen und Hilfsmittel, insbesondere Hilfen
Dritter in Anspruch genommen:

- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der 8 isolierten *E. coli* -
Stämme durch Frau Barbara Plaschke, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität Würzburg
- Serotypisierung dieser Stämme durch Herrn Prof. Dr. J. Bockemühl, Hygiene-In-
stitut Hamburg.

Ich habe die Dissertation an den folgenden Institutionen angefertigt:

- Fa. Laboklin, Labor für klinische Diagnostik GmbH, Prinzregentenstraße 3, 97688
Bad Kissingen

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen
ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, daß ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig
und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Danksagung

Frau Dr. Elisabeth Müller, Fa. Laboklin, Labor für klinische Diagnostik GmbH, Bad Kissingen, danke ich für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit zur Durchführung der Untersuchungen und für ihre Unterstützung in diversen fachlichen und organisatorischen Fragen.

Herrn Professor Dr. Dr. habil. Gunter Amtsberg vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich herzlich für seine wohlwollende, stets freundliche Betreuung und für seinen langen Geduldsfaden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Helge Karch vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, für seine stets gewährte Unterstützung in allen fachlichen Belangen und sein immer offenes Ohr für alle meine Sorgen und Nöte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Babette Klein, die mich mit viel Engagement und großer Hilfsbereitschaft auf den rechten Weg gebracht hat, sowie bei Frau Dr. Dorothea Geier-Dömling und allen anderen Mitarbeitern der Firma Laboklin, die mir mit Rat und Tat und vielen aufmunternden Worten zur Seite gestanden haben.

Bei Frau Barbara Plaschke vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bedanke ich mich für die Einführung in die Geheimnisse molekulargenetischer Arbeitstechniken und für ihre Hilfe beim charakterisieren der *E. coli* - Stämme.

Frau Dr. Ursula Heusinger nebst Praxisteam und Herrn Daniel Shineflew danke ich für ihre Hilfe beim Probensammeln und ihr großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Mein wärmster Dank gilt Herrn Joachim Knopp, der nach einem Festplattentotalschaden fast alle gesammelten Daten retten und so mein seelisches Gleichgewicht wieder herstellen konnte, sowie Herrn Thorsten Krafft für nächtelanges Formatieren und CD-Brennen in letzter Sekunde.

Vielen Dank an Stefan und alle andern, die mich ertragen haben, für Kaffee, eMails und lange Telefongespräche.