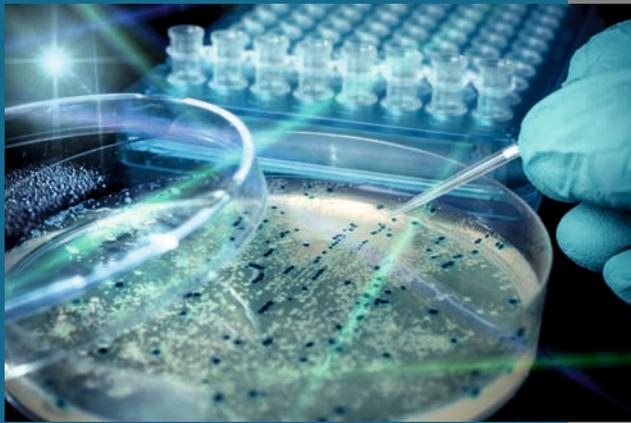


# EXPERIMENTELLE INFektion VON KÄLBERN MIT *ESCHERICHIA COLI* O104:H4

Katharina Maria Theresia Hamm



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Hygiene  
und Infektionskrankheiten der Tiere

Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Christian Menge

**EXPERIMENTELLE INFEKTION VON KÄLBERN MIT**  
***ESCHERICHIA COLI* O104:H4**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
im Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Katharina Maria Theresia Hamm**

Tierärztin aus Bad Neustadt a.d. Saale

Gießen (2015)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. C. Menge  
Prof. Dr. A. Wehrend  
Prof. Dr. C. Lämmler

Tag der Disputation: 19.10.2015

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**K. Hamm, S. Barth, S. Stalb, E. Liebler-Tenorio, J.P. Teifke, B. Hammerschmidt, E. Lange, E.A. Dean-Nystrom, M. Bielaszewska, H. Karch, C. Menge (2013):** Experimental Infection of calves with *Escherichia coli* O104:H4. Vortrag, 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V. und Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (DGI) e. V., 22. – 25.09.2013, Rostock

**K. Hamm, S. Barth, S. Stalb, E. Liebler-Tenorio, J.P. Teifke, E. Lange, G. Kotterba, E.A. Dean-Nystrom, M. Bielaszewska, H. Karch, C. Menge (2014):** Experimental Infection of calves with *Escherichia coli* O104:H4. Vortrag, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, 26. – 28.05.2014, Freising

**K. Hamm, S. Barth, S. Stalb, E. Liebler-Tenorio, J.P. Teifke, E. Lange, G. Kotterba, E.A. Dean-Nystrom, M. Bielaszewska, H. Karch, C. Menge (2014):** Experimental Infection of calves with *Escherichia coli* O104:H4. Vortrag, German Symposium on Zoonoses Research 2014 and 7th International Conference on Emerging Zoonoses, 16. – 17.10.2014, Berlin

**K. Hamm, S. Barth, S. Stalb, E. Liebler-Tenorio, J.P. Teifke, E. Lange, K. Tauscher, G. Kotterba, E.A. Dean-Nystrom, M. Bielaszewska, H. Karch, L. Geue, C. Menge (2015):** Experimental Infection of calves with *Escherichia coli* O104:H4. Poster, 9th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* (VTEC), 13. – 16.09.2015, Boston

Diese Arbeit wurde von der Europäischen Kommission gefördert im Rahmen des „Siebten Rahmenprogramms für Forschung und technologische Entwicklung“ (FP7), Projekt „ANTICIPATING the Global Onset of Novel Epidemics“ (ANTIGONE, Projektnr. 278976).

**1 Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>2</b>
<b>4.1</b>	<b>Definition enterohämorrhagischer <i>E. coli</i> (EHEC).....</b>	<b>2</b>
<b>4.2</b>	<b>Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC) .....</b>	<b>2</b>
4.2.1	Virulenzfaktoren der STEC.....	2
4.2.2	STEC-Infektionen beim Menschen.....	5
4.2.3	STEC-Infektionen beim Rind.....	8
<b>4.3</b>	<b>EAEC .....</b>	<b>17</b>
4.3.1	Virulenzfaktoren der EAEC .....	17
4.3.2	EAEC-Infektionen beim Menschen .....	19
4.3.3	EAEC-Infektionen beim Rind.....	20
<b>4.4</b>	<b><i>E. coli</i> O104:H4.....</b>	<b>21</b>
4.4.1	Virulenzfaktoren von <i>E. coli</i> O104:H4 .....	21
4.4.2	O104:H4-Infektionen beim Menschen.....	23
4.4.3	O104:H4-Infektionen beim Rind .....	26
<b>4.5</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>28</b>
5.1.1	Bakterienstämme .....	28
5.1.2	Primer .....	29
5.1.3	Antiseren .....	31
5.1.4	Shigatoxin-Chargen.....	31
5.1.5	Zelllinie .....	32
<b>5.2</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden .....</b>	<b>32</b>
5.2.1	Versuchsaufbau .....	32
5.2.2	Versuchsdurchführung .....	33
5.2.3	Gewinnung der Blut-, Kot- und Gewebeproben .....	35
<b>5.3</b>	<b>Bakteriologische Methoden .....</b>	<b>36</b>
5.3.1	Fäkale Ausscheidung Antibiotika-resistenter, coliformer Keime .....	36
5.3.2	Herstellung und Testung der Inokulationssuspensionen.....	37

5.3.3	Anzüchtung und Bestimmung der Gesamtkeimzahl .....	38
5.3.4	Anzucht zur Resistenzbestimmung .....	39
5.3.5	Objektträgerschnellagglutination (OSA).....	40
5.3.6	Herstellung von Periplasma-Fractionen (Polymyxin B-Präparation) .....	40
<b>5.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
5.4.1	Koloniehybridisierung.....	41
5.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	42
5.4.3	Präparation von Plasmid-DNS .....	45
5.4.4	Agarosegelelektrophorese .....	45
<b>5.5</b>	<b>Histologische Methoden .....</b>	<b>46</b>
5.5.1	Euthanasie, Sektion, makroskopische Beurteilung und Probennahme .....	46
5.5.2	Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten .....	49
5.5.3	Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung der Schnitte.....	49
5.5.4	Immunhistologische (IH-) Färbung von <i>E. coli</i> -Antigen im Paraffinschnitt .....	50
5.5.5	Lichtmikroskopische Beurteilung der histologischen Schnitte .....	50
<b>5.6</b>	<b>Zellkulturmethoden.....</b>	<b>51</b>
5.6.1	Kultivierung der Verozellen.....	51
5.6.2	Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) .....	52
5.6.3	Verozell-Neutralisationstest (Vero-NT).....	56
<b>5.7</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
<b>6.1</b>	<b>Ergebnisse der Vortestung der Versuchstiere .....</b>	<b>59</b>
<b>6.2</b>	<b>Ergebnisse der klinischen Untersuchung .....</b>	<b>61</b>
<b>6.3</b>	<b>Ausscheidung der Inokulationsstämme.....</b>	<b>64</b>
6.3.1	Ausscheidung über den Kot .....	64
6.3.2	Nachweis der Inokulationsstämme in einzelnen Darmabschnitten.....	69
<b>6.4</b>	<b>Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung des Gewebes.....</b>	<b>73</b>
6.4.1	Darmgewebe.....	73
6.4.2	Darminhalt.....	74
6.4.3	Darmlymphknoten.....	75
6.4.4	Makroskopische Befunde am übrigen Tierkörper.....	76
<b>6.5</b>	<b>Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchung.....</b>	<b>79</b>
6.5.1	Darmwand und Schleimhaut-assoziiertes Lymphgewebe.....	79
6.5.2	Übrige histologisch untersuchte Organe .....	92

---

<b>6.6</b>	<b>Vergleich zwischen den bakteriologischen, makroskopischen und histologischen Befunden.....</b>	<b>94</b>
<b>6.7</b>	<b>Charakterisierung der LB226692-Re-Isolate.....</b>	<b>97</b>
6.7.1	Stabilität und Vorkommen des pAA-Plasmids .....	98
6.7.2	Stabilität und Vorkommen des ESBL-Plasmids .....	101
<b>6.8</b>	<b>Nachweis Stx-neutralisierender Antikörper .....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
7.1	Infektionsmodell .....	106
7.2	Ergebnisse der experimentellen Infektion.....	109
7.3	Charakterisierung der LB226692-Re-Isolate.....	117
7.4	Fazit.....	119
7.5	Ausblick .....	120
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Summary.....</b>	<b>123</b>
<b>10</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>125</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>148</b>
11.1	Datentabellen zu den Versuchstieren .....	148
11.2	Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	154
11.2.1	Geräte .....	154
11.2.2	Chemikalien .....	155
11.2.3	Verbrauchsmaterial .....	158
11.3	Verwendete Puffer und Medien .....	160
11.3.1	Puffer und Medien für die bakteriologischen Methoden .....	160
11.3.2	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	161
11.3.3	Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturmethoden .....	164
11.3.4	Puffer und Reagenzien für die histologischen Methoden .....	165
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>167</b>

## 2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	dpi	<i>days post inoculation</i> , Tage nach Inokulation
°C	Grad Celsius	Duo	<i>Duodenum</i>
µg	Mikrogramm	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
µl	Mikroliter	<i>eae</i>	Strukturgen des Intimin
µm	Mikrometer	EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
µM	mikromolar	EAST1	<i>EAEC heat-stable enterotoxin</i>
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>	EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
A/E	<i>attaching/effacing</i>	Efa1	<i>EHEC factor for adherence</i>
AA	aggregative Adhärenz	<i>efa1</i>	Strukturgen des Efa1
AAF	aggregativ adhärenente Fimbrien	EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
Abb.	Abbildung	Ehly	Enterohämolysin
Abo	<i>Abomasum</i>	<i>ehxA</i>	Strukturgen des Enterohämolysin
abs	absolut	EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
AC	<i>Ansa centralis</i>	ESBL	<i>Extended-Spektrum Beta-Laktamase</i>
ad	bis zu (auffüllen auf)	<i>esc</i>	Strukturgen für <i>E. coli secretion apparatus</i>
Ak	Antikörper	Esp	<i>E. coli secreted protein</i>
<i>astA</i>	Strukturgen für EAST1	<i>esp</i>	Strukturgen für <i>E. coli secreted protein</i>
ATCC	American Type Culture Collection	<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
BALT	Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe	ETEC	enterotoxische <i>Escheichia coli</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	Fa.	Firma
bp	Basenpaare	FFS	flüchtige Fettsäuren
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin	FKS	fetales Kälberserum
bzw.	beziehungsweise	<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ca.	zirka	<i>g</i>	Gramm
CASO(B)	Casein-Sojamehl-Pepton(-Bouillon)	GA	Gassner-Agar
CD <sub>50</sub>	verozytotoxische Dosis 50 %	GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i> , Darm-assoziiertes Lymphgewebe
Cec	Zäkum	GB	Gallenblase
cm	Zentimeter	Gb <sub>3</sub>	Globotriaosylzeramid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	Gb <sub>4</sub>	Globotetraosylzeramid
CT	Computertomographie	GIT	Gastrointestinaltrakt
d	Tag(e)	h	Stunde(n)
d.h.	das heißt	H+L	<i>heavy chains+light chains</i> , schwere Ketten+leichte Ketten
DAB	Diaminobenzidine (3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid)	HC	hämorrhagische Colitis
DC	distales Kolon	HCl	Salzsäure
DIG	Digoxigenin	He	Herz
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	HE	Hämalaun-Eosin
DNS	Desoxyribonukleinsäure	HEp	humanes Larynxkarzinom-Epithel
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate	hpi	<i>hours post inoculation</i> , Stunden nach Inokulation
DPBS	Dulbecco´s PBS-Puffer		

HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
HUSEC	HUS-assoziierte <i>E. coli</i>	NeKo	Negativkontrolle
i.v.	<i>intravenös</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium-Ion
ICE	Ileozäkklappe	Ni	Niere
ICE-LN	<i>Lymphonodus cecalis</i>	Nr.	Nummer
IE	Internationale Einheiten	nm	Nanometer
Ig	Immunglobulin	nM	nanomolar
IH	Immunhistologie	OD	optische Dichte
Iha	<i>iron-regulated gene A</i> -homologes Adhäsın	OG	Obergrenze
IL	Interleukin	OSA	Objektträgerschnellagglutination
InCI1	Inkompatibilitätsgruppe I1	P-LN	<i>Lymphonodus popliteus</i>
IPP	Peyer-Platten des <i>Ileums</i>	Pans	Pansen
Jej	<i>Jejunum</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
JPP	Peyer-Platten des <i>Jejunum</i>	PC	proximales Kolon
kbp	Kilo-Basenpaare	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
KbE	Kolonie-bildende Einheiten	Pet	<i>plasmid-encoded toxin</i>
kDa	Kilodalton	PMN	polymorphkernige Leukozyten
kg	Kilogramm	PoKo	Positivkontrolle
Konz.	Konzentration	-R <sup>R</sup>	Resistenz
Le	Leber	RAJ	<i>rectoanal junction</i> , rektoanale Übergangszone
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>	Ref	Referenz
LM	Lebendmasse	rel	relativ
<i>Ln./Lnn.</i>	<i>Lymphonodus/i</i>	RNS	Ribonukleinsäure
log	Logarithmus	rStx2 <sub>WT</sub>	rekombinant hergestelltes Shigatoxin 2 ohne Mutation
LPS	Lipopolysaccharid	RT	Raumtemperatur
Lu	Lunge	RTX	<i>repeats in toxin</i>
max	maximal	SDS	Natriumdodecylsulfat
MDa	Megadalton	s.o.	siehe oben
Mes-LN	<i>Lymphonodus jejunalis</i>	sek	Sekunde(n)
mg	Milligramm	<i>sep</i>	Strukturgen für <i>secretion of E. coli proteins</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	SepA	<i>Shigella extracellular protease</i>
Mi	Milz	SH	Schleimhaut
min	Minute(n)	ShET1	<i>Shigella enterotoxin 1</i>
ml	Milliliter	SigA	<i>Shigella IgA-like protease homolog</i>
mM	millimolar	spp	<i>species pluralis</i>
mm	Millimeter	SPATEs	<i>serine protease auto-transporters of Enterobacteriaceae</i>
Mo	Monat(e)	SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	STEC	Shigatoxin-produzierende <i>E. coli</i>
n.t.	nicht testbar	Strep	Streptomycin
NaCl	Natriumchlorid	Stx	Shigatoxin
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat		
NaOH	Natriumhydroxid		
Nal	Nalidixinsäure		
NB	Nährbouillon		
NBF	neutral gepufferte Formalin nach Lillie (4 %ig)		

## 2 Abkürzungsverzeichnis

---

<i>stx</i>	Strukturgen des Stx
syn	synonym
T3SS	Typ III-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tons	Tonsille
Tir	<i>translocated intimin receptor</i> , translozierter Intiminrezeptor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TV	Teilversuch
U	<i>unit</i> , Einheit
U/min	Umdrehungen je Minute
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UG	Untergrenze
UV	ultraviolett
Ver0-NT	Ver0zell-Neutralisationstest
Ver0-ZT	Ver0zell-Zytotoxizitätstest
V	Volt
v/v	Volumeneinheit
Wo	Woche(n)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

### 3 Einleitung

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind Zoonoseerreger und verursachen beim Menschen Erkrankungen mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie hämorrhagische Colitis (HC) und das hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS). Zwischen Mai und Juli 2011 kam es zum bisher größten HUS-Ausbruch in Deutschland und Europa. Schnell konnte ein ungewöhnlicher *E. coli*-Stamm als ursächliches Agens identifiziert werden. Der EHEC-Stamm des Serotyps O104:H4 kombiniert Virulenzfaktoren zweier unterschiedlicher *E. coli*-Pathovaren - der Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) und der enteroaggregativen *E. coli* (EAEC). Er bildet sowohl die für STEC typischen starken Zytotoxine, die als Shigatoxine (Stx) bezeichnet werden, als auch Adhäsine, die für die Anheftung von EAEC an die Darmwand verantwortlich sind [28]. Diese Merkmalskombination scheint beim Menschen für den besonders schweren Krankheitsverlauf im Rahmen des europäischen HUS-Ausbruches mit insgesamt 3842 Infizierten und 855 HUS-Erkrankten, von denen alleine in Deutschland 53 verstarben [246], verantwortlich zu sein [40, 251, 326]. Für den EHEC-Ausbruch wurden Bockshornkleesamen aus Ägypten als wahrscheinliche Infektionsquelle identifiziert. Die Herkunft der Kontamination der Samen liegt bislang noch im Dunkeln [80]. Mit dem EHEC-Stamm des Serotyps O104:H4 ist ein vollkommen neuer Typ von EHEC aufgetreten, der bislang nur im Verdauungstrakt von Menschen nachgewiesen wurde. Bei früheren EHEC-Ausbrüchen haben sich Menschen meist durch den Verzehr von mit Rinderkot kontaminierten Lebensmitteln (Rohmilch, nicht durchgegartes Fleisch, Gemüse u.a.), direkten Kontakt zu Rindern, Rinderkot oder mit Rinderkot verschmutzten Gewässern [79] und seltener durch Kontakt zu bereits erkrankten Personen infiziert. Dagegen konnte ein tierisches Reservoir für den O104:H4 Stamm bisher nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist die Rinderpopulation aber bisher kaum gegenüber dem Erreger exponiert worden. Die Aufnahme von Stx als potentiell Kolonisationsfaktor in das EAEC-Genom könnte Stämme dieses *E. coli*-Pathovaren, das vor allem an den Menschen adaptiert zu sein scheint, in die Lage versetzen auch Rinder zu kolonisieren und von dort aus in die Lebensmittelkette eingetragen zu werden.

Als Beitrag zur Beantwortung der Frage, ob der EHEC-Stamm des Serotyps O104:H4 Wiederkäuer als Reservoir nutzen könnte, wurde ein gut etabliertes experimentelles Infektionsmodell [73] genutzt und die Reaktion des Wirtes auf den Erreger untersucht sowie eine quantitative und qualitative Analyse der Erregerausscheidung durchgeführt.

## 4 Literaturübersicht

### 4.1 Definition enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC)

*Escherichia coli* (*E. coli*) sind gram-negative Stäbchenbakterien, die in der natürlichen Darmflora von Säugetieren vorkommen. Neben kommensal lebenden *E. coli*-Stämmen gibt es jedoch auch pathogene Stämme. Diese werden nach ihren wichtigsten Eigenschaften in verschiedene Pathovaren unterteilt. Einzelne *E. coli*-Stämme bilden das sogenannte Shigatoxin (Stx) und werden deshalb im Pathovar der Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) zusammengefasst. Einige STEC-Stämme können lebensbedrohliche Erkrankungen des Menschen, wie die hämorrhagische Colitis (HC) und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen und werden deshalb als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet. EHEC können des Weiteren aufgrund spezifischer Oberflächenantigene (O-, H-, K-Antigen) mikrobiologisch in unterschiedliche Serotypen differenziert werden. Dabei treten einige Serotypen häufiger im Zusammenhang mit HUS auf als andere.

EHEC gehören zu den wichtigsten Erregern von Lebensmittelinfektionen [79]. Rinder stellen das Hauptreservoir für STEC einschließlich der humanpathogenen EHEC dar. EHEC können direkt oder indirekt vom Tier auf den Menschen übertragen werden und gehören somit zu den zoonotischen Krankheitserregern. Da es keine spezifische Therapie für das EHEC-bedingte HUS des Menschen gibt, hat die Verhinderung der Infektion des Menschen größte Priorität. Als wichtigste Präventionsmaßnahmen gelten die Einhaltung der Lebensmittel- (v.a. ausreichendes Erhitzen, Pasteurisieren), Küchen- und Händehygiene.

### 4.2 Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC)

#### 4.2.1 Virulenzfaktoren der STEC

##### Shigatoxin

Das von den STEC gebildete Toxin wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem Toxin des Bakteriums *Shigella dysenteriae* als Shigatoxin (Stx) bezeichnet [220]. Synonym verwendet wird der Begriff Vero-Toxin, der sich von den Verozellen, an denen die Zytotoxizität des Toxins zuerst getestet wurde, ableitet [159]. Stx sind potente eiweißartige Zytotoxine und stellen nicht nur die primären STEC-Virulenzfaktoren in der Pathogenese humaner Infektionen dar [210, 238], sondern wirken auch als immunmodulierende Agenzien während der STEC-Infektion von Rindern [118]. Die Stx-kodierenden Gene befinden sich im Genom

temperenter lambdoider Bakteriophagen, welcher ihre DNS in das *E. coli*-Wirtszellgenom integrieren. Nach der vom Promotor  $p_R$  ausgehenden Induktion der Phagen erfolgt die Produktion von Stx im Zusammenhang mit dem Replikationszyklus des Phagen im Rahmen einer sogenannten SOS-Antwort der Bakterien [312]. Ausgelöst wird dieser Prozess durch verschiedene Faktoren der intestinalen Umgebung wie der Kontakt zu intestinalen Epithelzellen und Makrophagen oder zu Wasserstoffperoxid produzierenden neutrophilen Granulozyten [273, 300, 311]. Auch einige Antibiotika können diesen Zyklus induzieren [323]. Über Transduktion ermöglichen die Phagen auch einen horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen *E. coli*-Stämmen [262]. Durch Aufnahme mehrerer Stx-konvertierender Phagen können einzelne Stämme auch mehr als einen Toxintyp bilden.

Es sind zwei immunologisch nicht kreuzreaktive Gruppen der Stx bekannt [287]: Stx1 (mit den Subtypen 1a [259], 1c [327] und 1d [51]) und Stx2 (mit den Subtypen 2a [259], 2b [231], 2c [263], 2d [185], 2e [317], 2f [261] und 2g [170]). Dabei scheint dem Toxintyp bei der Ausbildung eines HUS beim Menschen eine große Bedeutung zuzukommen. Bei einer Mehrzahl der HUS-Fälle konnte entweder nur Stx2 oder Stx2 in Kombination mit Stx1 isoliert werden. Bei unkompliziert verlaufenden Fällen mit Diarrhoe ohne HUS scheinen dagegen Stx1-bildende *E. coli* vorzuherrschen [25, 149]. Das Toxin ist aus einer A- und einer B-Untereinheit (UE) aufgebaut. Die A<sub>1</sub>-UE beinhaltet die enzymatische Aktivität und ist über eine Disulfidbrücke mit der A<sub>2</sub>-UE verbunden. Letztere bindet fünf identische B-Untereinheiten, welche für die Bindung des Toxins an den spezifischen Glykolipidrezeptor Globotriaosylceramid (Gb<sub>3</sub>) syn. CD77 der eukaryotischen Zellen verantwortlich sind. Nur Stx2e, typischerweise assoziiert mit der Ödemkrankheit der Schweine, nutzt Globotetraosylceramid (Gb<sub>4</sub>) als zellulären Rezeptor. Nach der Bindung wird das Holotoxin endozytiert und zum Golgi-Apparat bzw. anschließend zum endoplasmatischen Retikulum transportiert. Nach Translokation der A<sub>1</sub>-UE ins Zytoplasma entfaltet sie ihre zytotoxische Wirkung durch Interaktion mit ribosomaler RNS und folgender Inhibition der Proteinsynthese.

Infektionen mit STEC bei Mensch und Tier sind strikt enterale Infektionen mit eventuell anschließender systemischer Intoxikation. Der Einfluss des Toxins auf das Kolonisationsverhalten der STEC im Darm ist noch weitestgehend unklar. In mehreren Studien konnte ein Einfluss des Toxins auf die Kolonisation im Darm des Rindes nachgewiesen werden [74, 118], andere zeigten jedoch keinen Unterschied in Menge und Dauer der Ausscheidung zwischen Stx-positiven Wildtypstämmen und entweder isogenen Stx-negativen Deletions-

mutanten oder isogenen Phagen-depletierten Mutanten [64, 272]. Stx beeinflusst jedoch nachweislich die sich entwickelnde Immunantwort der Kälber und kann somit durch eine frühzeitige Behinderung der Entwicklung einer Antigen-spezifischen Immunität zum persistierenden Charakter der Infektion beitragen [187].

### ***Locus of enterocyte Effacement (LEE)***

Ein häufiges Merkmal von EHEC-Infektionen sind die A/E-Läsionen des Darmepithels. Diese sind charakterisiert durch die enge Anheftung der Bakterien an die Darmepithelzellen (A = *attachment*) einhergehend mit dem lokalen Verlust der Mikrovilli (E = *effacement*) [210]. Die Gene der hierfür verantwortlichen Proteine befinden sich auf einer chromosomalen Pathogenitätsinsel, dem sogenannten *Locus of Enterocyte Effacement (LEE)* [181]. Dieser besteht aus drei funktionalen Regionen [144]. Die zentrale Region enthält das *eae* Gen, welches das Membranprotein Intimin codiert. Dieses bindet sich irreversibel an den ebenfalls in dieser Region kodierten translozierten Intiminrezeptor (*translocated intimin receptor, Tir*) der vom Bakterium über ein Typ III-Sekretionssystem (T3SS) in das Zytosol der Wirtszelle injiziert wird und sich anschließend in die Zellmembran der Wirtszelle integriert [147]. Als weitere mögliche Rezeptoren wurden  $\beta$ 1-Integrine und Zelloberflächen-assoziiertes Nucleolin identifiziert [86, 276]. Intimin ist somit der Hauptfaktor für die enge Anheftung des Bakteriums an die Darmepithelzelle [210]. Es gibt mindestens 16 unterschiedliche Intimintypen ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2/ $\theta$ ,  $\delta$ / $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\xi$ ,  $\omicron$ ) [93], die eine Heterogenität im für die Rezeptorbindung verantwortlichen C-terminale Ende aufweisen. Diese Variabilität wird unter anderem für die spezifische Anheftung der EHEC im Dickdarm im Gegensatz zur spezifischen Anheftung der EPEC im Dünndarm verantwortlich gemacht [210]. Der Intimintyp kann zwischen den einzelnen Serotypen variieren. So wird das  $\gamma$ 1 Intimin mit hochpathogenen STEC-Serotypen wie O157:H7 und O145:H- in Verbindung gebracht [35, 36].

Die Region oberhalb der zentralen Region enthält Gene wie z.B. *esc* (= *E. coli secretion apparatus*) und *sep* (= *secretion of E. coli proteins*), welche den T3SS kodieren. Dieser vermittelt u.a. die Sekretion der Esp (= *E. coli secreted protein*), welche in der dritten Region kodiert sind [132]. Diese werden vermehrt nach dem Kontakt mit der Wirtszelle gebildet. Das filamentöse EspA bildet dabei eine Art molekulare Nadel durch den die anderen Proteine in die Wirtszelle geschleust werden können. Ergänzend dazu bilden das EspB in der Wirtszellmembran und das EscC in der äußeren Bakterienmembran Poren. Auf diesem Weg gelangt auch Tir in die Wirtszelle. Tir und andere LEE-kodierten Effektorproteine (z.B. TccP) führen

zu einer Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden und induzieren so lokale zytoskeletale Veränderungen. Diese äußern sich in einer Aktinanreicherung lokal an der Anheftungsstelle, sogenannte „pedestals“, die schließlich zu A/E-Läsionen führen [87, 88].

Der LEE spielt eine wichtige Rolle bei der Kolonisation des bovinen Intestinums. So wirkt sich sowohl ein Fehlen des *eae*-Gens [63, 272, 305] als auch des Tir-Rezeptors [272, 284] negativ auf die Kolonisation (d.h. sowohl auf die Höhe als auch auf die Dauer der Ausscheidung) von EHEC aus. Ebenso wirkt sich das Fehlen des kompletten T3SS [305] oder auch des LEE4-Operons (kodiert *sepL*, *escF*, *espA*, *B*, *D* & *F*) [216] negativ auf die Kolonisation aus. Intimin könnte als Virulenzfaktor an der Pathogenese des Kälberdurchfalls beteiligt sein [121, 320]. Beim Menschen spielt der LEE eine wichtige Rolle bei der Entstehung der HUS. Es werden jedoch auch weitere intestinale Adhäsionsfaktoren vermutet, da zum Beispiel auch Stämme ohne *eae*-Gen HC oder HUS auslösen können [210].

### Weitere Virulenzfaktoren

Ein Großteil der STEC bildet weitere Toxine wie das *EAEC heat-stable enterotoxin* (EAST1), welches zuerst in EAEC beschrieben wurde (Abschnitt 4.3.1). Es könnte für die initiale Phase der wässrigen Diarrhoe während einer EHEC-Infektion des Menschen verantwortlich sein [256]. Die meisten STEC besitzen ein 60 MDa großes Plasmid, welches Gene (*ehxA*) für ein Enterohämolysin (Ehly) codiert [260]. Das zur Familie der RTX-Toxine gehörende Toxin könnte durch Lyse von Erythrozyten eine Rolle als Eisenlieferant für die Bakterien während des Infektionsgeschehens spielen. Auch der membranschädigende Effekt auf eine Vielzahl von Zellen und die Fähigkeit die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu induzieren, könnte einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben [289].

Neben Intimin wird noch weiteren Adhäsionsfaktoren, wie dem *iron-regulated gene A*-homologes Adäsin (Iha) und dem *EHEC factor for adherence* (Efa1), eine Bedeutung zugeschrieben [218, 291]. Ein Fehlen des Efa1 wirkt sich negativ auf die Kolonisation des bovinen Intestinums aus [283]. Auch wurden mehrere Fimbrienadhäsine beschrieben [108].

### 4.2.2 STEC-Infektionen beim Menschen

Im Jahr 1983 wurden das erste Mal Stx-bildende *E. coli* mit dem Auftreten von HC [138, 221, 245] und HUS [152, 245] beim Menschen in Verbindung gebracht. Der Mensch infiziert sich vor allem durch die orale Aufnahme von kontaminierten Nahrungsmitteln bovinen Ursprungs (Rohmilch, nicht durchgegartes Fleisch) [41, 245], durch direkten Kontakt zu Rindern [58,

175] oder durch fäkale Verunreinigung der Umwelt (Trinkwasserreservoir, Badeseen) [6, 171] und anderer landwirtschaftlicher Erzeugnisse [22, 198]. Seltener kommt es zu einer Infektion durch Kontakt zu bereits erkrankten Personen [16, 17, 249]. Kinder sind empfänglicher für die klinischen Manifestationen nach STEC-Infektionen als Adulte. Von 2001 bis 2010 waren bei 696 HUS-Fällen 69 % der Erkrankten in Deutschland unter 5 Jahren alt [246]. Die meisten Ausbrüche von STEC-Infektionen wurden durch *E. coli*-Stämme des Serotyps O157:H7 hervorgerufen, dennoch treten auch Infektionen mit anderen Serotypen wie O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 und O145:H28/H- auf [108, 183, 210].

Die Infektionsdosis ist mit unter 100 – 200 Organismen sehr gering [210, 297]. Nach der oralen Aufnahme und Durchlaufen des sauren Magenmilieus setzen STEC im Darmlumen Stx frei. Das freigesetzte Stx führt durch Zerstörung von absorptiven intestinalen Epithelzellen zur Flüssigkeitsakkumulation im Darmlumen [143, 154]. Außerdem kommt es zur Bildung von Stx-unabhängigen A/E-Läsionen. Klassische A/E-Läsionen konnten bisher nur in Zellkulturmodellen [129, 157, 233], jedoch nicht in Gewebeproben vom Menschen nachgewiesen werden. Neben der Darmbarriere wird die intestinale Mikrovaskulatur geschädigt. Letztere ist durch Gb<sub>3</sub>-Rezeptoren [130] empfänglich für die zytotoxischen Wirkungen der Shigatoxine. Histopathologisch sind Hämorrhagien, Ödeme und fokale Neutrophileninfiltrationen in der *Lamina propria* zu beobachten. Außerdem treten in der Mukosa fokale Nekrosen und akute Entzündungsvorgänge unter Erhaltung der tiefen Krypten und Ausbildung von Pseudomembranen auf [104].

Das freigesetzte Stx wird, da humane intestinale Epithelzellen keine für die Bindung des Toxins benötigten Gb<sub>3</sub>/CD77-Rezeptoren exprimieren [32, 119, 190, 265, 266], transzellulär auf einem Gb<sub>3</sub>/CD77-unabhängigen Weg durch das Darmepithel aufgenommen und anschließend systemisch verteilt [1, 126, 127]. Die Art und Weise der Translokation durch das Darmepithel scheint sich jedoch für Stx1 und Stx2 zu unterscheiden [126]. Sowohl Stx1 als auch Stx2 binden an Erythrozyten [30] und obwohl Stx auch an zirkulierenden polymorphkernige Leukozyten (PMN) bei HUS-Patienten nachgewiesen werden konnte, ist die Bedeutung dieses Transportes zu den Zielorganen noch unklar [294, 295]. Systemische Auswirkungen des Toxins sind von der Verteilung des Gb<sub>3</sub>/CD77 im Gewebe abhängig. Der Nachweis von Gb<sub>3</sub>/CD77 korreliert meist mit der Empfänglichkeit der Zellen oder Gewebe gegenüber einer zytotoxischen Wirkung der Shigatoxine. Dem Stx kommt dabei nach der Rezeptor-medierten Endozytose meist nicht nur eine zytoletale, sondern auch eine modulierende Wirkung zu [187]. Beim Menschen spielt vor allem das Vorkommen des

Rezeptors in der Mikrovaskulatur der renalen Glomeruli [55, 176] und im ZNS [78, 242] sowie in den glomerulären Epithelzellen [125] eine Rolle bei der Entstehung des HUS. Histopathologisch stellt sich das HUS mit einer Verengung der glomerulären Kapillaren von außen durch aufgetriebene glomeruläre Endothelzellen und subendotheliale Regionen sowie von innen durch Ablagerung von Thrombozyten und Fibrin dar [191]. Die daraus resultierende abfallende glomeruläre Filtrationsrate führt zu einer akuten Niereninsuffizienz. Außerdem kommt es zu einer mikroangiopathisch-hämolytischen Anämie und einer Thrombozytopenie.

Klinisch tritt nach einer Inkubationszeit von 3 bis 4 Tagen [16, 210] eine wässrige Diarrhoe mit krampfartigen abdominalen Schmerzen und teilweise kurzzeitigem Fieber und Erbrechen auf. Nach 1 bis 2 Tagen entwickeln 90 % der Patienten eine hämorrhagische Colitis mit blutiger Diarrhoe. In ca. 90 % der Fälle kommt es zu einer spontanen Ausheilung ohne Spätfolgen, bei 10 – 15 % der Patienten unter 10 Jahren (und vielen älteren Patienten) kommt es jedoch nach 5 bis 13 Tagen zur Entwicklung des HUS. Dies führt bei 3 – 5 % der Patienten zum Tod, 12 – 30 % der Patienten entwickeln Spätfolgen wie Nierenschäden, Hypertension, Diabetes mellitus und neurologische Erkrankungen [148, 210].

Die Dauer der Ausscheidung von STEC O157:H7 ist sehr unterschiedlich. Bei Studien in den USA zeigte sich eine Ausscheidung von max. 7 Tagen bei 66 % der Patienten [290] bzw. eine mittlere Ausscheidungsdauer von 17 Tagen (Spanne von 2 bis 62 Tage) [17]. Auch eine deutsche Studie zeigt eine mittlere Ausscheidungsdauer von 13 Tagen (Spanne von 2 bis 62 Tage) bei Patienten mit Durchfall oder HC und von 21 Tagen (Spanne von 5 bis 124 Tage) bei Patienten mit HUS, wobei die Langzeitausscheider am Ende der Ausscheidungsperiode asymptomatisch waren. Auch bei anderen Serotypen (O26:H11, O145:NM) liegt die Ausscheidungsdauer zwischen 15 und 37 Tagen [189]. Des Weiteren trat auch eine intermittierende Ausscheidung auf [146]. In Einzelfällen können STEC nachweislich über längere Zeiträume bis zu 5 Monaten ausgeschieden werden [226].

Es gibt keine spezifische Therapie für das EHEC-bedingte HUS des Menschen. Der Einsatz von Antibiotika ist umstritten. Es gibt positive Berichte über den Einsatz von Antibiotika, speziell Fosfomycin, bei denen Patienten, die in den ersten beiden Tagen der Erkrankung behandelt wurden, signifikant seltener ein HUS entwickelten als unbehandelte Patienten [128]. Andere Studien zeigten jedoch, dass das Risiko ein HUS zu entwickeln durch eine antibiotische Behandlung gesteigert wird, da sie zu einer Induktion der Stx-Phagen und somit zur Produktion von Stx im Rahmen der SOS-Antwort der Bakterien führt [323]. Dabei

scheinen sich die Antibiotika je nach Stoffklasse zu unterscheiden. Fluoroquinolone wie z.B. Ciprofloxacin steigern signifikant die Stx-Produktion [329], während andere Antibiotika wie z.B. Carbapeneme einen inhibierenden Effekt haben [168]. Eine Antibiotika-Therapie ist nur nach strenger Indikationsstellung angebracht. Die weitere Behandlung erfolgt symptomatisch z.B. über parenterale Flüssigkeitszufuhr und intensivmedizinische Betreuung [148, 292].

### 4.2.3 STEC-Infektionen beim Rind

#### Natürliche Infektionen

Rinder werden bereits im frühen Kälberalter mit einer Vielzahl unterschiedlicher STEC-Stämme durch horizontale und vertikale Übertragung infiziert und können die Erreger über lange Zeiträume ausscheiden [60, 90, 268]. Mehrere Studien zeigten einen Nachweis von STEC in über 50 % der untersuchten Bestände [33, 34, 97, 316]. Die Einzeltierprävalenz bei Untersuchungen an natürlich infizierten Rinderherden kann je nach Tierbestand und -gruppe bei 0 – 100 % liegen [33, 34, 97, 316]. Auch die Höhe und Dauer der Ausscheidung variiert sehr stark. STEC O157:H7 haben in den meisten Studien eine deutlich geringere Einzeltierprävalenz von unter 20 % als nicht-O157 STEC [23, 33, 34, 57, 97, 109, 330]. Häufig auftretende nicht-O157 STEC sind in einigen Studien die Serotypen O26:H11 und O165:H25 [97], in anderen Studien gehörten ca. 50 % der isolierten STEC-Stämme den Serogruppen O2, O8, O20, O22, O77, O82, O105, O113, O126, O162 und O171 an [33, 34].

Die Ausscheidung ist dabei sowohl vom einzelnen Individuum als auch von äußeren Faktoren, die das Individuum beeinflussen, abhängig. So zeigt sich in vielen Studien eine starke Saisonalität der Ausscheidung mit Spitzen im Frühjahr und im Sommer [23, 57, 110]. Einige Studien konnten keinen Unterschied in der Prävalenz bei jungen und bei adulten Tieren finden [34], während andere Studien eine höhere Ausscheidungsrate bei Kälbern als bei adulten Tieren aufzeigten [227, 318]. Auch eine höhere Prävalenz bei abgesetzten Kälbern als bei Saugkälbern wurde beschrieben [92, 330]. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass Rinder meist nur transient infiziert sind und den Erreger bis zu 1 Monat ausscheiden. Nach initialer Vermehrung im Darm kommt es jedoch bei einigen Tieren zur Etablierung einer persistierenden Infektion mit monatelangem Ausscheidertum, ohne dass dabei erkennbare Krankheitserscheinungen ausgebildet werden, die man dem Stx zuschreiben könnte. Diese persistent infizierten Rinder stellen eine ständige Ansteckungsquelle dar und können somit für eine intermittierende Ausscheidung bei Kontakttieren und eine andauernde Herdeninfektion ursächlich sein [23, 318].

Ähnliche Krankheitserscheinungen wie das HUS beim Menschen sind beim Rind nicht zu erwarten. Ging man lange Zeit davon aus, dass Wiederkäuern der für die Bindung des Toxins an eukaryotische Zellen benötigte spezifische Gb<sub>3</sub>/CD77-Rezeptor im Darm fehlt [239], so konnte in einigen neueren Studien das Vorkommen von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf Darmepithelzellen des Rindes nachgewiesen werden [116, 187, 193]. Die Sensitivität von Zellen gegenüber den zytoletalen Effekten der Stx hängt jedoch nicht nur vom Vorkommen des Gb<sub>3</sub>-Rezeptors sondern auch von der Rezeptorverteilung- und struktur ab [81, 153]. Bei bovinen Darmepithelzellen führt die im Gegensatz zu humanen Zielzellen unterschiedliche Verteilung des Gb<sub>3</sub>/CD77 zu einer verringerten Sensitivität gegenüber Stx [117, 174]. Auch konnte bei Rindern Gb<sub>3</sub>/CD77 zwar in Endothelzellen großer Blutgefäße nachgewiesen werden [31, 193], in der intestinalen und renalen Mikrovaskulatur fehlen die Rezeptoren jedoch, was vor den systemischen Effekten des Shigatoxins schützen könnte [116, 239]. Bovine Granulozyten besitzen kein Gb<sub>3</sub>/CD77 [187] und können weder durch Stx aktiviert werden, noch wie beim Menschen zu einer verstärkten Stx-Aufnahme führen [127] oder als Toxin-Transporter fungieren [294, 295]. In der Folge treten beim Rind keine intestinalen Entzündungssymptome auf. A/E-Läsionen, hervorgerufen durch auf dem LEE codierte Proteine, sind jedoch auch bei natürlich infizierten Rindern bekannt [216].

Stx wirken jedoch über die Hemmung boviner Lymphozyten als immunmodulierende Agenzien während der bovinen STEC-Infektion. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zeigten, dass Stx während der frühen Aktivierungsphase auf Immunzellen einwirkt und nicht eine bestehende Immunität wieder herunterreguliert [118, 280]. Das Vorkommen von Gb<sub>3</sub>/CD77 auf und die Resistenz boviner Epithelzellen gegen zytoletale Effekte der Stx lässt vermuten, dass Stx damit einen potentiellen Kolonisationsfaktor für das Rind darstellt. Die frühzeitige Behinderung der Entwicklung einer Antigen-spezifischen Immunität scheint zum persistierenden Charakter der Infektion beizutragen.

Folglich treten klinische Erscheinungen in Folge einer STEC-Infektion bei Rindern nur sehr selten auf. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Kälberdiarrhoe und einer hohen Prävalenz von STEC ausgemacht werden [97, 120, 319]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass STEC sich unter bestimmten Voraussetzungen (Koinfektionen) und Umweltfaktoren auch auf die Kälbergesundheit auswirken. Es wird über Fälle von Durchfall und Colitis mit A/E-Läsionen im Zusammenhang mit dem Auftreten von STEC-Stämmen der Serotypen O5:H-, O26:H11, O111:H- und O118:H16 bei meist nur wenige Wochen alten Kälbern berichtet [107, 201, 264]. Häufig sind auch Rota- und Coronaviren,

sowie Kryptosporidien am Krankheitsgeschehen beteiligt [70]. Stx1-positive Stämme sind dabei öfter an der Entwicklung von Kälberdurchfall beteiligt, als Stx2-positive Stämme [34, 319]. O157-STECS führen im Gegensatz zu Nicht-O157-STECS (z.B. O26) seltener zu Krankheitserscheinungen bei Rindern. Ein Grund könnten unterschiedliche Mechanismen sein, den Darm von Wiederkäuern zu kolonisieren [99, 305].

### **Infektionsmodelle beim Rind**

Zur Untersuchung der Mechanismen der Kolonisation von STEC in Wiederkäuern gibt es unterschiedliche Infektionsmodelle. Ziel dieser Modelle ist unter anderem die Identifizierung von Bakterien- und Wirtsfaktoren, die die Kolonisation von STEC begünstigen, sowie die Aufdeckung von Interaktionen zwischen diesen beiden. Diese Erkenntnisse sollen Maßnahmen ermöglichen, die die Ausscheidung von STEC durch Lebensmittel-liefernde Tiere verringern und die Infektionsgefahr für den Menschen reduzieren.

Als bevorzugte Tierart dient dabei das Rind (Tab. 1). Obwohl auch andere Wiederkäuer wie Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer als Quelle humaner Infektionen beschrieben wurden, stellen Rinderbestände das wichtigste natürliche Reservoir für STEC und somit die häufigste Infektionsquelle für den Menschen dar [105, 178, 210]. Modelle mit kleinen Wiederkäuern [62, 102, 166, 271, 313, 314] weisen neben ähnlichen anatomischen und physiologischen Gegebenheiten meist jedoch eine höhere Praktikabilität auf.

Bei den in Infektionsmodellen eingesetzten STEC-Stämmen handelt es sich vor allem um Serotypen, die bei der Infektion von Menschen dominierend vorherrschen, d.h. *E. coli* des Serotyps O157:H7 und O26:H<sup>-</sup> [105, 210, 248, 305]. Neben der üblichen Applikation eines einzelnen Stammes pro Tier wurden auch mehrere Stämme pro Tier inokuliert [45, 111, 271, 331], unter anderem um die Abhängigkeit einer erfolgreichen Kolonisation des Wirtes von stammspezifischen Kolonisationsfaktoren zu ermitteln. Um gezielt die Bedeutung einzelner Virulenzfaktoren für die Kolonisation zu erforschen, wurden auch genetisch manipulierte Stämme eingesetzt [63, 64, 216, 283]. Für den O104:H4 Ausbruchstamm von 2011 wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt nur Versuche an Mäusen und Kaninchen durchgeführt, die mehr als Model der Pathogenese des HUS und der blutigen Diarrhoe als zur Beschreibung eines Reservoirwirtes dienten [251, 326].

**Tab. 1:** Experimentelle Infektionsmodelle zur Kolonisation von STEC in Rindern

Studie	Tier-zahl	Tieralter	Dosis (KbE)	Serotyp	Applikation	Klinik	Ausscheidung	Histologie	Sektionstag
Moxley <i>et al.</i> [201]	3*	24 h	10 <sup>9</sup>	O5:K4:H-	oral	+	-	+	3- 7 dpi
Cray and Moon [66]	17	3 - 14 Wo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7	oral	+	über 27 Wo.	-	3 - 18 dpi (n = 9)
	12	1 - 3 Jahre	10 <sup>10</sup>		Sonde	-	bis 14 Wo.	-	2 - 4 dpi (n = 3)
	5	1 - 3 Jahre	10 <sup>7</sup>		Sonde	-	2/5	x	x
	5	1 - 3 Jahre	10 <sup>4</sup>		Sonde	-	keine	x	x
Brown <i>et al.</i> [45]	9	8 Wo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7 (5 Stämme)	Sonde	+	bis 27 dpi	-	13 - 27 dpi
Dean-Nystrom <i>et al.</i> [75]	10	< 12 h (K-)	10 <sup>10</sup>	O157:H7	oral	+	10/10	+	18 hpi & 3 dpi
	3	30 - 36 h (K-)				+	3/3	+	18 hpi
	4	30 - 36 h (K+)				+	4/4	+	18 hpi
Zhao <i>et al.</i> [331]	6	ca. 10 Wo.	2 x 10 <sup>9</sup>	O157:H7 (5 Stämme) + Probiotika	Sonde	-	bis 29 dpi	-	29 dpi
Dean-Nystrom <i>et al.</i> [72]	9	ca. 10 Wo.	2 x 10 <sup>9</sup>	O157:H7 (5 Stämme)		-	bis 32 dpi	-	32 dpi
	9	3 - 4 Mo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7	Sonde	+	-	+	4 dpi
Harmon <i>et al.</i> [111]	9	8 - 12 Wo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7 (5 Stämme)	Sonde	-	über 25 dpi	-	28 - 32 dpi
Ohya <i>et al.</i> [223]	3	3 Mo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7	Sonde	-	bis 31 Wo.*	x	x
Sanderson <i>et al.</i> [253]	4	1 Woche	5 x 10 <sup>8</sup>	O157:H7	oral	-	bis 43 dpi	x	x
Magnuson <i>et al.</i> [177]	8	9 - 12 Mo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7	Sonde	-	bis 69 dpi	-	x
Ohya <i>et al.</i> [224]	8	4 Mo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7 + Probiotika	oral	-	bis 28 dpi	x	x
Cornick <i>et al.</i> [63]	8	1 Jahr	10 <sup>10</sup>	O157:H7 (2 Stämme; <i>eae+</i> & <i>eae-</i> )	oral	-	bis 60 dpi* ( <i>eae+</i> : 4/8, <i>eae-</i> : 1/8)	x	x
Grauke <i>et al.</i> [102]	18	1 Jahr	3 x 10 <sup>8</sup>	O157:H7	Sonde	-	bis 69 dpi	x	x
			bis 4 x 10 <sup>10</sup>						
	4	3 - 5 Jahre	2 x 10 <sup>11</sup>			-	bis 34 dpi	x	x

**Tab. 1** (Fortsetzung)

Studie	Tierzahl	Tieralter	Dosis (KbE)	Serotyp	Applikation	Klinik	Ausscheidung	Histologie	Sektionstag
Stevens <i>et al.</i> [283]	5	4 - 11 Tage	10 <sup>10</sup>	O111:H- ( <i>efal</i> +) oral	-	bis 6 dpi <sup>#</sup>	+	3 dpi (n = 1)	
	5	4 - 11 Tage		O111:H- ( <i>efal</i> -)	-	bis 6 dpi <sup>#</sup>	x	3 dpi (n = 1)	
	4	4 - 11 Tage		O5:H- ( <i>efal</i> +) oral	+	bis 7 dpi <sup>#</sup>	x	x	
	4	4 - 11 Tage		O5:H- ( <i>efal</i> -) oral	-	bis 7 dpi <sup>#</sup>	x	x	
Naylor <i>et al.</i> [214]	12	8 - 14 Wo.	10 <sup>9</sup>	O157:H7 (Stx+) Sonde	-	bis 24 dpi	+	14 - 28 dpi	
	7	8 - 14 Wo.		O157:H7 (Stx-) Sonde	-	bis 28 dpi	+	20 - 28 dpi	
Sheng <i>et al.</i> [271]	18	5 Mo.	10 <sup>7</sup>	O157:H7 oral	-	bis 30 dpi <sup>#</sup>	x	x	
	10	7 Mo.	5 x 10 <sup>10</sup>	O157:H7 (4 Stämme) oral	-	bis 54 dpi <sup>#</sup>	x	x	
	16	5 Mo.	2 x 10 <sup>7</sup>	O157:H7 rektal	-	bis 55 dpi <sup>#</sup>	x	x	
	8	7 Mo.	10 <sup>9</sup>	O157:H7 (4 Stämme) rektal	-	bis 66 dpi <sup>#</sup>	x	x	
van Diemen <i>et al.</i> [305]	4	4 Tage	10 <sup>10</sup>	O157:H7 oral	-	über 8 dpi	+	4 dpi (n = ?)	
	4	4 Tage		O26:H oral	+	über 8 dpi	+	4 dpi (n = ?)	
Naylor <i>et al.</i> [216]	6	13 - 25 Wo.	10 <sup>9</sup>	O157:H7 (2 Stämme; LEE4- & LEE4+) Sonde	x	bis 2 dpi (LEE4-), bis 14 dpi <sup>#</sup> (LEE4+)	x	x	
Hoffman <i>et al.</i> [118]	2	3 & 5 Mo.		O157:H7 (Stx-) Sonde	x	-	+	14 - 21 dpi	
	5	6 - 8 Wo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7 (Stx+) Sonde	-	bis 20 dpi <sup>#</sup>	x	x	
	5	6 - 8 Wo.		O157:H7 (Stx-) Sonde	-	bis 6 dpi	x	x	
Bretschneider [43]	6	16 Mo.	10 <sup>9</sup>	O157:H7 oral	-	bis 42 dpi <sup>#</sup>	x	x	
Naylor <i>et al.</i> [217]	25	ca. 2 Mo.	2 x 10 <sup>10</sup>	O157:H7 oral	-	bis 15 dpi <sup>#</sup>	x	x	
Dean-Nystrom <i>et al.</i> [74]	30	3 - 5 Mo.	10 <sup>10</sup>	O157:H7 Sonde/ oral	-	bis 4 dpi (16/29)	+	4 dpi	
	25	3 - 5 Mo.		O157:H7 + DEX Sonde	+	bis 4 dpi (24/25)	+	4 dpi	
Jonsson <i>et al.</i> [140]	4	6 - 9 Wo.	10 <sup>9</sup>	O157:H7 Sonde	-	bis 43 dpi	x	14 - 55 dpi	
Allen <i>et al.</i> [8]	30	5 - 8 Mo.	10 <sup>9</sup>	O157:H7 + Vakzine Sonde	-	bis 7 dpi	x	x	
	30	5 - 8 Mo.	5 x 10 <sup>9</sup>	O157:H7 + Placebo Sonde	-	bis 7 dpi	x	x	

**Erläuterung:** \* gnotobiotisch, # entspricht dem Ende des Beobachtungszeitraumes, +: klinische/histologische Befunde vereinbar mit einer STEC Infektion, -: keine klinischen/histologischen Befunde, x: nicht durchgeführt/nicht dokumentiert, **K-/+**: ohne/mit Kolostrumgabe, **dpi** = Tage nach Inokulation, **KbE** = Kolonie-bildende Einheiten, **Mo.** = Monate, **Wo.** = Wochen

Die Versuche variierten auch in der eingesetzten Inokulationsdosis. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der erfolgreich kolonisierten Tiere mit der Höhe der Inokulationsdosis stieg. So waren in einer Studie bei einer Dosis von  $10^4$  KbE/Tier bei keinem der adulten Tiere, bei einer Dosis von  $10^7$  KbE/Tier nur bei 40 % der inokulierten adulten Tiere die STEC in niedrigen Raten im Kot wieder nachweisbar. Mit einer Inokulationsdosis von  $10^{10}$  KbE/Tier konnten die Tiere erfolgreich über einen längeren Zeitraum kolonisiert werden [66]. In einer anderen Studie schieden bei einer niedrigeren Inokulationsdosis ( $10^7$  KbE/Tier) zwar alle Tiere die Inokulationsstämme zu mindestens einem Zeitpunkt wieder aus, jedoch sinkt die Zahl der ausscheidenden Tiere schneller ab, als bei höheren Inokulationsdosen (ca.  $5 \times 10^{10}$  KbE) [271]. Auch bei Schafen steigt mit der Höhe der Inokulationsdosis die Höhe und Dauer der Ausscheidung an [160]. Zu den am häufigsten angewandten direkten Inokulationsmethoden gehören die orale Inokulation, die Inokulation über Pansensonden und die rektale Inokulation. Einzelne Studien zeigten eine höhere Kolonisations- und Ausscheidungsrate bei der rektalen Inokulation als bei oraler Inokulation oder indirekter Inokulation [271]. Solche indirekte Inokulation (Tier-zu-Tier-Übertragung) wurde mehrfach erfolgreich angewandt [24, 62, 140, 160, 214, 271]. Der Kontakt eines naiven Tieres zu einem STEC-ausscheidenden Tier kann zu ähnlichen Nachweisraten bei dem naiven Tier wie bei direkt inokulierten Tieren führen [24]. Dabei zeigte sich eine große Abhängigkeit dieses Übertragungsweges von den äußeren Bedingungen wie Jahreszeit und Haltung [271]. Eine Ausscheidungsrate von  $< 10^5$  KbE/g reichte in einigen Studien für eine Kontaktübertragung aus [62], in anderen Studien konnte damit jedoch kein Nachweis bei naiven Tieren erbracht werden [160]. Auch eine Übertragung vom Jungtier zum Muttertier ist möglich [160].

Um ein stabiles Infektionsmodell zur genauen Untersuchung der Kolonisation von STEC im Rinderdarm zu etablieren, wurden neben einer hohen Inokulationsdosis Strategien entwickelt möglichst viele experimentell infizierte Rinder auch dauerhaft zu kolonisieren. Zu diesem Zweck wurde Kälbern vor der Inokulation immunsupprimierende Dosen von Dexamethason verabreicht [74, 285]. Dexamethason wird eingesetzt, um stressinduzierte Effekte auf die Wirtsabwehr zu simulieren und Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Wirt unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Dabei wird keine generelle Suppression aller Immunfunktionen ausgelöst, sondern differenzierte Effekte auf Lymphozytensubpopulationen und deren Funktionen [188]. Die Verabreichung von Dexamethason verändert das weiße Blutbild im Sinne eines Stressleukogramms mit Neutrophilie, Eosinopenie, Lymphopenie und Monozytose [9]. Im Infektionsmodell führt dies zu höheren Nachweisraten von STEC in der Fäzes und den einzelnen Darmabschnitten sowie zum vermehrten Auftreten von A/E-Läsionen. Die

Dexamethason-Behandlung erhöht somit die Empfänglichkeit der Kälber für eine STEC-Infektion [74].

Die Ausscheidungsraten der inokulierten *E. coli* variierten stark zwischen den einzelnen experimentell infizierten Tieren. Dabei traten diese Unterschiede sowohl bei Rindern wie auch bei Schafen unabhängig von Rasse, Alter, Inokulationsdosis, Inokulationsstamm oder Fütterung auf. Als mögliche Gründe werden Unterschiede der tierspezifischen Immunität, der physiologischen und biochemischen Konditionen im GIT, der kompetitiven Mikroflora und der genauen Lokalisierung der Infektion angeführt [102]. Auch zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kälbern und adulten Tieren bezüglich der Höhe und Dauer der STEC-Ausscheidung. Kälber scheiden unabhängig von der Kotmenge STEC in höheren Zahlen und über einen längeren Zeitraum aus [66]. Dabei scheint vor allem der Entwicklungsgrad der Vormägen von Bedeutung zu sein [66, 102]. Auch eine hohe Zellproliferationsrate im GIT scheint einen vermindernden Effekt auf die Ausscheidung von STEC zu haben [177]. In den meisten Studien nahm die Zahl der ausgeschiedenen STEC nach einer initial sehr hohen Ausscheidung über eine Zeitdauer von 2 - 3 Wochen deutlich ab. Neben Tieren, die den inokulierten Stamm nur über kurze Zeit oder in geringen Mengen ausschieden, konnten mehrfach sogenannte „*supershedder*“ beobachtet werden, die STEC meist intermittierend über einen sehr langen Zeitraum ausschieden [43, 45, 49, 66, 140, 156, 214, 223].

Unterschiedliche Lokalisationen wurden als primärer Kolonisationsort der STEC im GIT der Rinder identifiziert. Lange galten die Vormägen als primärer Kolonisationsort [45, 111, 331]. Dem widersprachen jedoch nachfolgende Studien, die eine rasche Elimination des Erregers aus dem Pansen postulierten und den Dickdarm als bevorzugte Lokalisation identifizierten [49, 102]. Dabei scheint bei der Kolonisation der Vormägen vor allem das Alter der Tiere und somit der Entwicklungsgrad der Vormägen eine entscheidende Rolle zu spielen [102]. Speziell für den STEC O157:H7 wurde die rektale Übergangszone (*rectoanal junction*, RAJ) als primärer Kolonisationsort identifiziert [72, 214, 216]. Für Nicht-O157-STECS wie die Serogruppen O5 und O26 werden andere Mechanismen und Lokalisationen der Kolonisation des Darmes vermutet [99, 164, 305]. Histologische Veränderungen durch STEC O157:H7 wie A/E-Läsionen konnten in vielen Studien nur sehr inkonstant nachgewiesen werden. Dabei scheint es einen Zusammenhang zwischen der bakteriologisch nachgewiesenen Keimmenge zum Zeitpunkt der Sektion und dem Nachweis von A/E-Läsionen zu geben. So gelang in einer Studie der Nachweis von A/E-Läsionen 4 dpi im Rektum bzw. Zäkum nur, wenn bakteriologisch  $> 10^6$  KbE/g Gewebe bzw.  $> 10^5$  KbE/g Gewebe nachgewiesen werden

konnten [72]. In einer weiteren Studie der gleichen Autorin war der Nachweis von A/E-Läsionen 4 dpi im Ileum, Zäkum, distalen Kolon (DC), der Gallenblase und der Galle an eine fäkale Ausscheidung von  $> 10^5$  KbE/g Kot geknüpft. An der RAJ und der Ileozäkalklappe (ICE) konnten A/E-Läsionen jedoch auch bei Tieren mit einer niedrigeren Ausscheidung nachgewiesen werden. Dies spricht für eine vorrangige Kolonisation der O157-STECC an diesen Lokalisationen [74]. Anderen Autoren gelang der Nachweis von A/E-Läsionen nicht, vermutlich da entweder bakteriologisch nur  $< 10^6$  KbE/g Gewebe nachgewiesen werden konnten [66] oder die Sektion zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt stattfand (13 - 32 dpi) [45, 111, 331]. Es ist wahrscheinlich, dass der fehlende Nachweis von A/E-Läsionen eher auf die stark fokale Verteilung der mikroskopischen Läsionen und nicht auf das fehlende Vorhandensein eben dieser zurückzuführen ist [72]. Bei sehr jungen Tieren (12 h bis 11 d) konnten häufiger A/E-Läsionen detektiert werden [75, 201, 282, 305, 313, 314].

Der Einfluss der Fütterung auf die Ausscheidung von STECC war Gegenstand mehrerer Untersuchungen. Die Studien liefern jedoch immer wieder gegensätzliche Aussagen, welche Rolle die Art der Fütterung bei der Höhe und Dauer der Ausscheidung spielt. Das Wachstum von *E. coli* wird normalerweise durch einen hohen Gehalt an flüchtigen Fettsäuren (FFS) in Kombination mit einem niedrigen pH-Wert gehemmt [244, 274, 322]. Eine faserreiche Fütterung führt jedoch zu einem Anstieg des pH-Wertes und einem Abfall des Gehaltes an flüchtigen Fettsäuren im Pansen [111, 244, 298]. Somit konnten in einigen Studien eine längere Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 bei faserreicher im Vergleich zu nährstoffreicher Fütterung nachgewiesen werden [122, 161, 304]. Auch neuere Untersuchungen zeigten eine verminderte Ausscheidung von STECC bei einer Stärke-reichen Fütterung, jedoch gegenläufig eine erhöhte Gesamtzahl an *E. coli* sowie von säureresistenten *E. coli* bei dieser Fütterung [76, 98]. In anderen Studien wiederum kam es entweder zu einer höheren Ausscheidung bei nährstoffreicher Fütterung [298] oder aber es war kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Futtermitteln erkennbar [177]. Die Entwicklung einer Säureresistenz, die bei vielen STECC auftritt [18, 173], könnte die ausbleibende Korrelation zwischen der ruminalen FFS-Konzentration und der STECC-Ausscheidung erklären [111]. Auch die Verfütterung unterschiedlicher Getreidearten als Stärkequelle hat Auswirkungen auf die STECC-Ausscheidung. So wird z.B. Stärke aus Mais bedeutend langsamer im Pansen abgebaut als Stärke aus anderen Getreidearten wie Gerste [134, 296]. Der Anteil der im Dickdarm mikrobiell abgebauten Stärke dürfte bei Mais also dementsprechend höher sein, was zu einer höheren fäkalen FFS-Konzentration und einem niedrigeren pH-Wert führt. Folglich konnte bei einer Gerste-Fütterung eine höhere STECC-Ausscheidung als bei einer Mais-basierten Fütterung

nachgewiesen werden [20, 49]. Auch ein abrupter Futterwechsel hat Auswirkungen auf die STEC-Ausscheidung. So konnte eine gesteigerte STEC-Ausscheidung beim Umstieg von einer nährstoffreichen auf eine faserreiche Fütterung gezeigt werden [98, 160, 161] bzw. eine verringerte Ausscheidung bei Umstellung von faser- auf nährstoffreich [69]. Die Gesamtzahl an *E. coli* scheint sich dabei jedoch immer gegensätzlich zu verhalten [69, 76]. Die Auswirkungen eines Futterentzuges auf die STEC-Ausscheidung sind nach wie vor unklar. Ähnlich wie bei einer faserreichen Fütterung kommt es zu einem Abfall des Gehaltes an FFS und einem Anstieg des pH-Wertes im Pansen [52, 111]. Während in einigen Studien ein Futterentzug bei einzelnen Tieren zu erhöhten Ausscheidungsraten führte [46, 102, 160, 177, 253], konnte in anderen kein Zusammenhang festgestellt werden [45, 111, 161]. Es zeigte sich jedoch, dass ein Fasten vor der Inokulation die Kolonisationsrate von STEC erhöht [67, 72]. Es wird vermutet, dass die Säurekonditionen im Pansen Auswirkungen auf die initiale Kolonisation mit STEC haben, jedoch die Ausscheidung nach erfolgreicher Kolonisation des Kolons nicht mehr beeinflussen [111]. Fraglich ist dabei, ob die Veränderungen der Pansen- und Darmflora nach dem Futterentzug und -wechsel die entscheidende Rolle spielen oder Unterschiede in der STEC-Ausscheidung durch die fütterungsabhängige Änderung der Kotkonsistenz bedingt sind [215].

Einige Studien untersuchten den Einsatz von Probiotika zur Minimierung der STEC-Ausscheidung. Durch den Einsatz von Laktat-produzierenden Bakterien im Versuchsverlauf konnte die Ausscheidung von O157:H7 in einigen Fällen gestoppt werden. Dafür wurde eine erhöhte Konzentration an flüchtigen Fettsäuren in den Fäzes verantwortlich gemacht [224]. Auch der Einsatz von nicht-STECC *E. coli*-Stämmen und *Proteus mirabilis* zeigte eine positive Wirkung, vermutlich basierend auf einer Rivalität um Bindungsflächen auf der Epitheloberfläche und der Produktion von inhibierenden Metaboliten [331]. Neuere Studien belegten einen hemmenden Effekt von rektal verabreichtem bovines Lactoferrin auf die STEC-Ausscheidung [156].

Unklar ist die Bedeutung der Immunreaktion der Tiere nach einer Infektion mit STEC und deren mögliche protektive Wirkung. Mehrfach wurde gezeigt, dass eine vorherige Exposition mit dem Erreger nicht vor erneuter Ausscheidung schützt [102], eine Ausscheidung nach Reinfektion jedoch manchmal vermindern kann [66, 139, 217, 253]. Eine Bildung von Antikörpern gegen *E. coli*-LPS und LEE-codierte Proteine (Intimin, Tir, EspA und EspB) hatte keine Auswirkungen auf die Dauer und Höhe der Ausscheidung [43, 118]. Eine vorherige Vakzination mit Proteinen des Typ III Sekretionsapparates scheint jedoch einen

reduzierenden Effekt auf die Ausscheidung des Inokulats zu haben [8]. Die Entwicklung einer adaptiven zellulären Immunantwort ist nach experimenteller Infektion von Kälbern mit Stx2-positiven STEC O157:H7 (Stamm 86-24) im Vergleich zu Kälbern, die mit einem Stx-negativen *E. coli* O157:H7 (Stamm 83-27) inokuliert worden waren, signifikant verzögert [118], so dass zellulären Abwehrmechanismen eine bisher noch nicht definierte Bedeutung für die Kontrolle der intestinalen STEC-Kolonisation zukommen könnte.

*E. coli*-Infektionen mit der Serogruppe O157 resultieren meist in einer effizienten Kolonisation, die nicht klinisch in Erscheinung tritt. Krankheitserscheinungen wie Fieber, wässrige bis blutige Diarrhoe, Rehydratation, Kolonödem und Ödeme der Gallenblasenserosa können jedoch altersabhängig bei Infektion von sehr jungen Tieren (< 3 Wochen) auftreten [75, 201, 283]. Dabei schützt auch die vorherige Gabe von Stx1- und O157-Antikörper-positivem Kolostrum nicht vor der Entwicklung der Symptome [75]. Gesunde ältere Tiere (> 3 Wochen) erkranken nur in Ausnahmefällen nach der Infektion mit O157:H7 [45, 66, 72]. Krankheitssymptome wie wässrige Diarrhoe und erhöhte Temperatur bei Tieren höheren Alters könnten vielfach auch auf Begleitinfektionen (Kokzidien) oder auf den Futterentzug vor der Inokulation zurückzuführen sein, zudem diese Symptome auch bei nicht-infizierten Kälbern häufig auftreten. Die Verabreichung von Dexamethason vor der Inokulation scheint die Entwicklung von Krankheitssymptomen zu begünstigen [74]. Auch bei experimentellen Infektionen mit anderen Serotypen (O5, O26, O111) kann bei sehr jungen Kälbern (4 d) Fieber und transients Durchfall auftreten [56, 264, 305].

## **4.3 EAEC**

### **4.3.1 Virulenzfaktoren der EAEC**

Bei der Pathogenese von EAEC-Infektionen lassen sich drei unterschiedliche Mechanismen unterscheiden: (1) Adhärenz an die Darmschleimhaut, (2) Bildung eines Biofilms und (3) Induktion der Freisetzung von Zytotoxinen mit einer milden Immunantwort des Wirtes. Für diese Pathogenitätsmechanismen sind verschiedene Virulenzfaktoren verantwortlich, die jedoch nicht konsistent in allen pathogenen Stämmen auftreten [210, 211].

#### **Adhärenz**

Bei den enteroaggregativen *Escherichia coli* (EAEC) handelt es sich um *E. coli*-Stämme, die über ihre besondere Form der Adhärenz an Wirtszellen definiert sind. Ihr Adhärenzmuster unterscheidet sich deutlich von der lokalisierten Adhärenz enteropathogener *E. coli* (EPEC),

weshalb die Stämme zu Beginn als diffus adhärente oder enteroadhärente *E. coli* bezeichnet wurden [179, 205, 257]. Der Nachweis einer prominenten Autoagglutination der Bakterienzellen, frei oder auf der Wirtszelloberfläche, führte zur Bezeichnung aggregative Adhärenz (AA) und zur Schaffung eines neuen Pathovars - der EAEC [206]. Durch die Ähnlichkeit mit aufgestapelten Mauersteinen heißt diese Formation auch *stacked-brick configuration*. EAEC sind somit definitionsgemäß *E. coli*, die weder das Hitze-stabile noch das Hitze-labile Enterotoxin der enterotoxischen *E. coli* (ETEC) sezernieren, sich jedoch an HEp-2-Zellen im typischen AA-Muster anheften [210]. Verantwortlich für die Adhäsion sind flexible Fimbrien (aggregativ adhärente Fimbrien (AAF)), die auf dem Virulenzplasmid pAA kodiert sind. Es sind fünf strukturelle Untereinheiten bekannt: AAF/I [207], AAF/II [68], AAF/III [21], AAF/IV [37] und AAF/V [71]. Neben der Adhärenz werden durch die AAF jedoch auch eine Zytokinfreisetzung [112] und die Zerstörung der Barrierefunktion epithelialer *tight junctions* [286] vermittelt. Es werden noch weitere Adhäsionsfaktoren vermutet [77, 196]. Ein Hilfsfaktor für die Anheftung ist das auf dem *aap*-Gen codierte Protein Dispersin [270]. Dieses bindet an die LPS-Moleküle auf der Bakterienoberfläche und neutralisiert so deren negative Ladung [307]. Dies ermöglicht es den positiv geladenen Fimbrien sich nach außen zu richten. Als zentraler Regulator dient AggR. Es vermittelt sowohl die Expression Plasmid-kodierter als auch chromosomaler Virulenzfaktoren [211]. AggR-positive EAEC werden als typische EAEC bezeichnet [204]. Bisher konnten nur typische EAEC mit Krankheitserscheinungen beim Menschen in Verbindung gebracht werden. AggR-negative EAEC, auch als atypische EAEC bezeichnet, scheinen keine oder kaum klinische Erscheinungen hervorzurufen [135, 225, 254].

### **Bildung eines Biofilms**

Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zu einer gesteigerten Mukussektion. Der entstehende muköse Biofilm ermöglicht es den Bakterien das lokale Immunsystem des Wirtes zu umgehen und führt in einigen Fällen zu einer persistierenden Kolonisation mit andauernder Diarrhoe. Die Biofilmbildung ist von den AAF oder funktionell ähnlichen Strukturen abhängig. Beteiligt an diesem Prozess sind auch die über die Gene *Fis* und *yafK* kodierten Proteine [124, 269]. Pic, ein chromosomal kodiertes Protein mit mukolytischer Aktivität, fördert das intestinale Wachstum des Bakteriums durch Nutzbarmachung von Nährstoffen aus dem Mukus [113].

## Zytotoxizität

Einige Stämme induzieren zytotoxische Effekte. Als Ursache werden verschiedene Zytotoxine vermutet. Mitbeteiligt scheint das auf dem Genlokus *astA* kodierte *EAEC heat-stable enterotoxin* (EAST1) [255], sowie das chromosomal kodierte *Shigella enterotoxin I* (ShET1) [15] zu sein. Neben diesen Zytotoxinen verursachen auch sogenannte *serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae* (SPATEs) Schleimhautschäden und führen zu einer Kolonisation des Darmes. SPATEs werden entweder chromosomal oder Plasmid-kodiert und in zwei phylogenetisch unterschiedliche Klassen eingeteilt. Klasse I SPATEs, wie das auf dem Virulenzplasmid pAA kodierte Enterotoxin *plasmid-encoded toxin* (Pet) [212] und das *Shigella IgA-like protease homolog* (SigA) [241], sind zytotoxisch für Epithelzellen. Klasse II SPATEs lösen unterschiedliche Effekte aus und beinhalten z.B. Pic (s.o.) und *Shigella extracellular protease* (SepA). Letzteres wird mit besonders virulenten Stämmen in Verbindung gebracht [39].

### 4.3.2 EAEC-Infektionen beim Menschen

In den 80er Jahren wurden erstmals in die heutige Klasse der EAEC eingeteilte *E. coli* als Ursache von Durchfällen bei Reisenden oder Kindern in Entwicklungsländern nachgewiesen [179, 206, 257]. Die Pathogenität der EAEC wurde in mehreren Studien mit Freiwilligen bestätigt [180, 208]. Neben sporadischen EAEC-Infektionen, die auf endemische Geschehen zurückzuführen sind, treten auch EAEC-Ausbrüchen auf [61, 279].

Das Hauptreservoir für EAEC ist die humane Population. EAEC werden fäkal-oral übertragen [114, 124]. Als Überträger kommen kontaminierte Lebensmittel [2, 142] oder Wasser [275] in Frage. Landwirtschaftliche Nutztiere wie Rinder, Schweine und Schafe scheinen kein Reservoir für EAEC darzustellen (Abschnitt 4.3.3). In Hunden und Katzen konnten jedoch typische EAEC nachgewiesen werden [240]. Aufgrund des seltenen Nachweises von EAEC bei Haustieren ist jedoch eher die Weitergabe zwischen Menschen und Tieren desselben Haushaltes, wie für andere *E. coli*-Stämme bekannt [136], wahrscheinlich. Es scheint sich hierbei nicht um ein echtes Reservoir zu handeln.

Die große Heterogenität unter den EAEC-Stämmen führt zu unterschiedlicher Ausprägung des Krankheitsbildes [208, 225]. Die Anheftung sowohl im Dün- als auch im Dickdarm bildet das erste Stadium in der Pathogenese [115, 158, 209]. Krankheitserscheinungen entstehen aber vor allem durch die Wirkung im Dünndarm [210]. Die EAEC heften sich in

großer Zahl mit dem typischen AA-Muster an das Darmepithel an und induzieren eine gesteigerte Mukussekretion. Unter diesem mukösen Biofilm bleibt der Bürstensaum intakt, es kommt nicht zur Ausbildung von A/E-Läsionen [115, 301]. Bei einigen Stämmen zeigen sich zytotoxische Effekte. Die Epithelschädigung äußert sich in einer Verkürzung der Mikrovilli, hämorrhagischer Nekrose der Zottenspitzen, dilatierten Kryptöffnungen, der Entwicklung prominenter interkryptaler Spalten und der Abschilferung der Enterozyten [115, 209, 308]. Die toxischen Effekte scheinen sich auf das Epithel des Dickdarmes zu beschränken und können nicht am Dünndarmepithel beobachtet werden [209]. Neben Epithelschäden führen die Toxine wie das EAST1 und das ShET1 allerdings auch zu einer gesteigerten Chlorid- und Flüssigkeitssekretion und somit zum Bild einer sekretorischen Diarrhoe [83, 186]. Von Seiten des Wirtes kommt es als Reaktion zu einer milden Entzündungsantwort mit Ödembildung und mononukleärer Infiltration in der Submukosa [308]. Hauptfaktor dafür ist das Flagellin, welches die Freisetzung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren (z.B. Interleukin-8) induziert [124, 281]. Auch die AAF scheinen an der IL-8-Freisetzung beteiligt zu sein [112]. Da ein Einzelnukleotid-Polymorphismus in der Promoterregion des Genes für den LPS-Korezeptor CD14 das Risiko einer EAEC-induzierten Diarrhoe erhöht, ist eine genetische Prädisposition des Wirtes für eine Manifestation der Krankheit nicht ausgeschlossen [192].

Bei gesunden Erwachsenen kommt es klinisch meist zur Entwicklung einer sich selbst limitierenden, wässrigen, sekretorischen Diarrhoe ohne Blut oder fäkale Leukozyten [208]. Teilweise kann es jedoch bei Kindern [61, 65] oder immunsupprimierten Menschen [94, 315] zu einem verlängerten Krankheitsverlauf (> 14 Tage) mit der Gefahr einer Dehydratation und Malnutrition oder der Entwicklung von blutiger Diarrhoe kommen. Besonders in Entwicklungsländern werden EAEC mit persistierender Diarrhoe in Verbindung gebracht [27, 82]. EAEC sind der zweithäufigste Grund für Durchfall bei Reisenden [124].

### 4.3.3 EAEC-Infektionen beim Rind

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten keine typischen (AggR-positiven) EAEC beim Rind nachgewiesen werden [53, 321]. Auch andere Tierarten wie Schweine und Schafe scheinen kein Reservoir für EAEC darzustellen [53]. Während einzelne Virulenzfaktoren wie das AAF/I codierende *aggA*-Gen ebenfalls nicht bei Rindern nachgewiesen werden konnten [228], konnten jedoch andere Merkmale der EAEC bei *E. coli*-Isolaten aus Rindern detektiert werden. So konnten *E. coli*, die die typische aggregative Adhärenz (AA) aufwiesen, beim Rind nachgewiesen werden, eine genaue geno- und phänotypische Charakterisierung blieb in dieser Studie jedoch aus [4]. Auch EAST1 konnte bei *E. coli*-Isolaten von verschiedenen

Tierarten nachgewiesen werden. EAST1 tritt jedoch auch bei anderen *E. coli*-Pathovaren wie EHEC, ETEC und EPEC auf [186, 256, 306, 321].

Bei vergleichenden Untersuchungen einer weiteren Studie von EAEC-Stämmen humanen und bovinen Ursprungs konnten beim Rind nur *E. coli*-Isolate nachgewiesen werden, die zwar die typische aggregative Adhärenz zeigten, denen jedoch die klassischen Virulenzfaktoren enteroaggregativer *E. coli* wie das *aggR*-Gen fehlten. Es wird spekuliert, dass beim Rind andere Virulenzgene die aggregative Adhärenz kodieren. Bovinen Isolate weisen die Gene *shf* und *irp2* auf, deren Rolle in der Pathogenese von EAEC-Infektionen jedoch noch weitestgehend unklar ist. Auch auf Basis der Serotypen konnte kein Zusammenhang zwischen den humanen und bovinen Isolaten hergestellt werden [302].

## **4.4 *E. coli* O104:H4**

### **4.4.1 Virulenzfaktoren von *E. coli* O104:H4**

Der EHEC-Stamm O104:H4 vom Ausbruchgeschehen im Mai 2011 kombiniert die Virulenzfaktoren zweier verschiedener *E. coli*-Pathogene [28]. Er bildet sowohl Merkmale der STEC als auch der EAEC aus.

#### **Merkmale der STEC**

Mit dem Stx<sub>2</sub>, kodiert durch *stx2a* [258], besitzt der O104:H4-Stamm den namensgebenden Virulenzfaktor der STEC [28]. Das *stx2a* zeigt eine 99 %ige Homologie zum *stx2a* des Referenzstammes EDL 933 des Serotypes O157:H7. Es unterscheidet sich nur in einem Nukleotid in der Gensequenz für jede Untereinheit [28]. Damit ist das Stx nahezu identisch mit dem Stx von O157-Stämmen aus Deutschland aus den Jahren 2002 und 2005 [258]. Ebenso gleichen sich die Insertionsstellen des *stx2a*-konvertierenden Phagen beim O104:H4-Stamm und bei Stamm EDL 933 [243]. Die genetische Ähnlichkeit zwischen Ausbruchstamm und vielen enteroaggregativen *E. coli* O104:H4 ohne Stx-kodierenden Phagen spricht dafür, dass die Aufnahme des Phagen ein jüngeres Ereignis war [243]. Die Aufnahme des Phagen aus dem tierischen STEC-Reservoir wird diskutiert [26]. Ein Verlust des Bakteriophagen während des Ausbruchgeschehens 2011 ist nicht bekannt [328].

Im Vergleich zu *E. coli* O157:H7 exprimiert der Ausbruchstamm im Mausmodell initial weniger Stx, bevor sich die gebildete Stx-Menge mit verlängerter Infektionsdauer erhöht. Die Stx-Expression korreliert dabei nicht mit der zäkalen Kolonisation [251]. In anderen Studien

zeigte sich neben einer verminderten Stx-Freisetzung eine im Vergleich zum EDL 933 auch signifikant geringere Translokation des Toxins durch einlagige Epithelzellschichten [299]. Trotzdem ist Stx2 in Tiermodellen mit Mäusen und Kaninchen für die hohe Virulenz des Stammes verantwortlich. Sowohl bei Mäusen, als auch bei Kaninchen führte der Stx-positive Wildtypstamm zu einer höheren Morbidität und Mortalität als ein Stx-negatives O104:H4-Isolat und ein Phagen-depletierter Mutant des Wildtypstammes [326]. In einem weiteren Kaninchen-Modell wirkt sich das Stx zwar nicht auf die Kolonisation des Darmes, aber auf die Entwicklung von Krankheitssymptomen oder histologischen Veränderungen aus [203]. Als weiteren Virulenzfaktor der STEC besitzt der Ausbruchstamm das Iha [184], welches mit der Adhärenz an Epithelzellen vor allem in *eae*-negativen STEC in Verbindung gebracht wird [291]. Weitere STEC-typische Virulenzmerkmale wie der LEE fehlen [28].

### **Merkmale der EAEC**

Der Ausbruchstamm enthält das ca. 83 kbp große Virulenzplasmid pAA. Dieses ist identisch mit dem Virulenzplasmid typischer EAEC. Auf dem Plasmid ist neben AAF/I auch der zentrale Regulator AggR kodiert, *astA* für EAST1 fehlt jedoch [184]. Die Ausbildung von AAF/I und Dispersin unter der Regulation von AggR führt zur typischen aggregativen Adhärenz in Zellkulturmodellen [28, 299]. In Zellversuchen reduziert die Ausschaltung von *aggR* oder *aggA* sowohl die bakterielle Adhärenz als auch die Translokation des Stx durch eine einlagige Epithelzellschicht signifikant [40]. Im Kaninchen-Modell wirkt sich ein Fehlen des pAA-Plasmides jedoch weder auf die Kolonisation des Darmes noch auf die Entwicklung von Krankheitssymptomen oder histologischen Veränderungen aus [203]. Trotz des relativ stabilen Verhaltens des pAA-Plasmides *in vitro*, zeigte sich das pAA-Plasmid während des Ausbruchgeschehens 2011 als ein relativ instabiles genetisches Element, welches in einigen Fällen während des Krankheitsgeschehens verloren ging. Die verminderte Fähigkeit Epithelzellen effektiv zu kolonisieren und somit eine geringere systemische Absorption von Stx durch den Wirt könnte zu einer verminderten Pathogenität dieser pAA-negativen Stämme geführt haben [328].

Wie bei typischen EAEC kommt es auch bei *E. coli* O104:H4 zu einer Biofilmbildung, welche positiv mit der Expression von *stx2* und *aggR* korreliert ist [251]. Der Ausbruchstamm bildet verschiedene Zytotoxine wie das ShET1 und SPATEs. O104:H4 unterscheidet sich jedoch in der Anzahl und Kombination seiner SPATEs (Pic, SigA und SepA) von herkömmlichen EAEC, welche selten mehr als 2 SPATEs besitzen [38, 243]. Besonders den chromosomal codierten Proteinen SigA und Pic wird im Kaninchen-Modell

ein Einfluss auf die Kolonisation des Stammes und sein Persistenzverhalten zugesprochen [203]. Auch dies könnte ein Grund für die erhöhte Virulenz des Stammes sein.

### Weitere Virulenzfaktoren

Neben dem pAA-Plasmid besitzt der O104:H4-Ausbruchsstamm ein ca. 90 kbp großes konjugativ übertragbares Plasmid, das zur Inkompatibilitätsgruppe II (IncII) gehört [184]. Dieses weist große Ähnlichkeit zum pEC\_Bactec-Plasmid auf [47, 184, 243], welches in verschiedenen *E. coli*-Isolaten humanen und tierischen Ursprungs identifiziert wurde [278]. Resistenzgene auf dem Plasmid kodieren eine *Extended-Spektrum Beta-Laktamase* (ESBL) vom Typ CTX-M-15 mit der vorgelagerten Insertionssequenz *ISEcpI* und eine Beta-Laktamase des Types TEM-1 [47, 184, 247]. Der Stamm zeigt entsprechend einen Resistenz-Phänotyp mit Resistenz gegenüber den Beta-Laktam Antibiotika der Gruppen der Acylamino-penicilline und Cephalosporine, ist aber empfindlich gegenüber Carbapenemen [28, 247]. Dieser ESBL-Phänotyp konnte bisher bei allen Isolaten aus dem Ausbruchgeschehen 2011 [100], jedoch bei keinem der anderen vor dem Ausbruch isolierten und sequenzierten O104:H4-Stämme nachgewiesen werden [3, 101, 184]. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei der Aufnahme des Plasmids um ein neueres Ereignis handelt oder dass die anderen Stämme das Plasmid verloren haben [243, 328]. Die Beta-Laktamase CTX-M-15 ist einer der häufigsten ESBL-Typen, der bei nosokomialen ESBL-*E. coli* nachgewiesen wird, konnte jedoch bisher nur bei wenigen Isolaten vom Tier detektiert werden [247].

Der Ausbruchsstamm zeigt eine höhere Säureresistenz als der EHEC O157:H7-Referenzstamm EDL 933. Dies könnte die Passage hoher Keimzahlen durch das saure Milieu des Magens begünstigen und somit zur Pathogenität des Stammes beitragen [184].

#### 4.4.2 O104:H4-Infektionen beim Menschen

Eine Kombination der Merkmale von STEC und EAEC, wie bei dem *E. coli*-Stamm des Serotyps O104:H4, der im Mai 2011 einen HUS-Ausbruch in Deutschland und Europa verursacht hat, wurde bisher nur selten beschrieben. Ein Stamm des Serotyps O111:H2 mit ähnlichen Eigenschaften löste 1995 eine Häufung von HUS-Erkrankungen in Frankreich aus [197]. Ein STEC/EAEC O111:H21 führte 2012 in Großbritannien zu einer HUS-Erkrankung [71]. In einer retrospektiven Studie aus Deutschland konnten aus einer Sammlung von etwa 2400 in den Jahren 2008 bis 2012 isolierten EHEC-Stämmen 2 weitere Isolate mit entero-aggregativen Eigenschaften identifiziert werden [237]. Auch der Serotyp O104:H4 trat bereits

mehrmals in Erscheinung. Als Prototyp gilt der 2001 in der Zentralafrikanischen Republik bei einem HIV-Patienten mit persistierender Diarrhoe isolierte Stamm 55989, der jedoch keine Virulenzfaktoren von EHEC aufweist [21, 47, 200, 243, 258]. Auch weitere reine EAEC-Isolate wurden immer wieder mit Durchfall bei Kindern in Zusammenhang gebracht [258]. Erste O104:H4-Isolate mit den Merkmalen beider Pathogene, die von Patienten mit HUS isoliert wurden, traten 2001 bei 2 Fällen in Deutschland [183], 2004 in Frankreich, 2005 in Korea und zwei Fälle 2009 in Georgien auf [258]. Der 2001 in Deutschland isolierte Stamm 01-09591 wird unter der Bezeichnung HUSEC041 in der HUSEC-Stammkollection geführt [183]. Zur Entstehung des Ausbruchstammes von 2011 gibt es unterschiedliche Hypothesen. Die Befunde sprechen dafür, dass der Ursprungstamm kein EHEC-Stamm war, der Virulenzmerkmale von EAEC übernommen hat, sondern ein EAEC, der einen Stx-kodierenden Prophagen und das Plasmid mit den ESBL-Genen über horizontalen Gentransfer aufgenommen hat [243]. In einem weiteren Modell wird davon ausgegangen, dass sich von einem dem Stamm 55989 ähnlichen Stamm über den Stamm HUSEC041 durch Aufnahme und Abgabe verschiedener Plasmide, Phagen und Genloki der Ausbruchstamm entwickelte [3]. Diesem linearen Modell der Entwicklung vom Stamm 55989 zum Ausbruchstamm wird ein Modell gegenüber gestellt, bei dem sich aus einem gemeinsamen Vorgänger parallel der Stamm 55989, der Ausbruchstamm und der Stamm HUSEC041 entwickelten [184].

Als Infektionsvehikel wurden bei dem Ausbruch 2011 Bockshornkleesamen zur Sprossenherstellung aus einem ägyptischen Betrieb identifiziert, auch wenn der Stamm nie direkt aus den Sprossen isoliert werden konnte [48, 80]. Die Infektionsdosis des Ausbruchstammes ist nicht genau bekannt, es ist jedoch davon auszugehen, dass sie wie bei klassischen STEC sehr niedrig ist [10, 151]. Während des Ausbruchgeschehens kam es auch zu Sekundärinfektionen durch Kontakt zu infizierten Personen [10, 246]. Der Stamm scheint gut an den Menschen angepasst zu sein und somit ist ein humanes Reservoir wahrscheinlich [151]. Während des Ausbruches in Deutschland erkrankten 2.987 Menschen an akuter Gastroenteritis und 855 an HUS. Der überwiegende Teil der Erkrankten war weiblichen Geschlechts (58 bzw. 68 %) und der Altersmedian betrug 46 bzw. 42 Jahre. Dies unterschied sich deutlich von klassischen EHEC-Infektionen, die vor allem im Kleinkindalter auftreten [246]. Ob diese Besonderheiten des Ausbruchs auf bestimmten Verzehrsgewohnheiten oder auf einer besonderen Empfänglichkeit beruhen, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt [84].

Die Merkmalskombination von Stx2 und EAEC scheint beim Menschen für den besonders schweren Krankheitsverlauf im Rahmen des europäischen HUS-Ausbruches verantwortlich

zu sein [151]. Es wird gemutmaßt, dass die erhöhte Anzahl von HUS-Fällen darauf zurückzuführen sein könnte, dass das Stx2a des O104:H4 im Vergleich zu klassischen STEC die Darmschleimhaut effektiver oder aber in größeren Mengen überwindet. Ersteres könnte eine Konsequenz aus unterschiedlichen Kolonisationsmechanismen und –lokalisationen sein [234]. Die bereits oben beschriebene geringere Stx2-Expression und –Freisetzung durch *E. coli* O104:H4 im Vergleich zum *E. coli* O157:H7 [251, 299] unterstützen die These, dass die erhöhte Virulenz des O104:H4 nicht auf einer größeren Menge an freigesetztem Stx beruht, sondern durch seine gesteigerten Fähigkeiten an das humane Kolonepithel zu adhären und im Darm zu kolonisieren. Dies könnte zu einem erhöhten Gewebeschaden durch das Bakterium an sich, jedoch auch durch die AAF/I-induzierte Immunantwort des Wirtes zu einer Störung der Barrierefunktion der Epithelzellen führen. Somit würde ein Durchdringen des Epithels durch das Stx und dessen systemische Absorption gefördert [28, 251, 299]. Die Zerstörung der Barrierefunktion epithelialer *tight junctions* durch die AAF, wie für die EAEC beschrieben [286], könnte hierbei eine zentrale Rolle spielen. Für diese Theorie spricht neben der verringerten bakteriellen Adhärenz in Zellkulturen auch die ausbleibende Biofilmbildung, Störung der Zellpermeabilität und die verringerte IL-8-Freisetzung bei pAA-negativen Isolaten [40]. An der Pathogenese der neurologischen Symptome scheinen dagegen vorrangig Antikörper gegen *E. coli* O104:H4 beteiligt zu sein. Dafür spricht die Zeitdauer vom Beginn der Durchfallsymptomatik bis zum Auftreten der ersten neurologischen Symptome von 5 – 12 Tagen, die kompatibel ist mit der Entwicklung einer sekundären IgG-Immunantwort. Eine schnelle und anhaltende Besserung der neurologischen Symptome ließ sich nach Durchführung einer Immunadsorption beobachten. Direkte toxische Effekte des Stx auf die Neuronen als alleinige Ursache der neurologischen Symptome werden dadurch unwahrscheinlich [103].

Im Vergleich zu Infektionen mit anderen STEC-Serotypen ist die Inkubationszeit bei EHEC O104:H4 mit ca. 8 Tagen deutlich länger [246]. Dann kann es zum Auftreten von blutiger Diarrhoe häufig mit krampfartigen abdominalen Schmerzen und teilweise mit Erbrechen kommen. Nur wenige der Patienten entwickeln Fieber [84, 303]. Vornehmlich tritt ein segmentaler Befall des deszendierenden Kolons mit einer im CT oder auf Röntgenaufnahmen abnormal verdickten Kolonwand mit vorgeschalteter Dilatation des transversalen und ascendierenden Kolons auf [13]. Endoskopisch kann eine hochgradige ulzerative Kolitis mit spontanen Blutungen der hochgradig entzündeten Mukosa festgestellt werden. Histologisch zeigt sich eine hochgradige Entzündung mit Infiltration von Lymphozyten und Granulozyten, eine ulzerative Zerstörung des Epithel und fibrinöse Ablagerungen [303]. Bei ca. 20 % der

Patienten kommt es nach im Mittel 5 Tagen zur Entwicklung des HUS. Die mittlere Dauer vom Auftreten erster Symptome bis zur Entwicklung eines HUS scheint somit kürzer zu sein, der Anteil an Patienten, die ein HUS entwickeln, jedoch höher als bei EHEC O157:H7 [151]. Entgegen früherer Fälle entwickelten fast 50 % der HUS-Patienten außerdem neurologische Symptome wie Desorientierung, kognitive Dissoziation, okulomotorische Dysfunktion, Somnolenz und epileptische Anfälle [131, 303]. Unter den HUS-Patienten verstarben 35 (4,1%) und unter den EHEC-Patienten mit Gastroenteritis 18 (0,6%) [246].

Ähnlich wie bei vorangegangenen EHEC-Ausbrüchen wurde *E. coli* O104:H4 durchschnittlich für eine Dauer von 17 – 18 Tagen ausgeschieden. Bei einzelnen Patienten konnte noch nach dem Abklingen klinischer Symptome eine Ausscheidung von bis zu 157 Tagen festgestellt werden. Patienten mit HUS schieden den Erreger signifikant kürzer, Kinder ( $\leq 15$  Jahren) signifikant länger aus [310]. Ebenso scheint eine Behandlung mit Azithromycin die Ausscheidungsdauer zu verkürzen [219, 310].

Die Behandlung erfolgte wie bei vorherigen HUS-Ausbrüchen symptomatisch mit parenteraler Flüssigkeits- und Elektrolytzufuhr, sowie intensivmedizinischer Betreuung und Überwachung der Nierenfunktion [151], Hämodialyse, Plasmapherese oder Immunadsorption [103]. Einige Patient wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Komplementprotein C5 behandelt, welcher eine Aktivierung der Komplementkaskade durch das Stx und folglich eine Zelllyse und Gewebeschäden verhindern sollte. Dieses unter dem Namen Eculizumab auf dem Markt befindliche Medikament konnte erfolgreich zur Behandlung eines HUS eingesetzt werden [167]. Der therapeutische Einsatz von Antibiotika ist wie bei klassischen STEC umstritten und muss je nach Stoffgruppe des Antibiotikums differenziert betrachtet werden. Während Ciprofloxacin *in vitro* den Stx2-Phagen des Ausbruchstammes induziert und zu einer höheren Stx-Freisetzung führt [29, 243], entwickelten Patienten, die während des Ausbruchgeschehens 2011 noch vor Entwicklung einer HUS mit Ciprofloxacin behandelt wurden, signifikant seltener HUS [95]. Fosfomycin, Gentamicin und Kanamycin führten *in vitro* zu keiner signifikanten Beeinflussung der Stx-Freisetzung und bei Chloramphenicol, Meropenem, Azithromycin, Rifaximin und Tigecyclin konnte sogar ein reduzierender Effekt beobachtet werden [29].

### 4.4.3 O104:H4-Infektionen beim Rind

In stichprobenartigen Untersuchungen von Rinderkotproben aus der Ausbruchsregion von 2011 und weltweit konnte der O104:H4 Ausbruchstamm nicht isoliert werden [12, 228, 321].

Zwar traten in keiner der untersuchten Kotproben alle Virulenzmerkmale des O104:H4 gemeinsam auf, einzelne Virulenzmerkmale konnten jedoch, zum Teil in verschiedenen Kombinationen, detektiert werden. So wurden z.B. in 6,1 % bis 15,3 % der Kotproben die Kombination aus *wzx*<sub>O104</sub><sup>-</sup>, *fliC*<sub>H4</sub><sup>-</sup> und *stx2*-Genen gefunden. Ob diese jedoch alle auf ein und dasselbe Isolat zurückzuführen sind, wurde nicht untersucht [12, 228]. In einer mexikanischen Studie konnten aus 251 Kotproben 656 *E. coli*-Stämme isoliert werden, von denen 3 Isolate vom Serotyp O104:H12 waren und das *stx2*-Gen besaßen [213]. Auch die ESBL-Resistenzgene wie *bla*<sub>CTX-M-15</sub> können häufig bei Rindern gefunden werden [321].

In einer Studie wurden bei 27 % der untersuchten Tiere Antikörper gegen das *E. coli* O104-LPS detektiert. Eine Kreuzreaktion mit anderen Serogruppen wie z.B. O9 konnten die Autoren jedoch nicht ausschließen [213].

#### **4.5 Ziel der Arbeit**

Mit dem EHEC O104:H4 trat im Jahr 2011 ein neuartiger *E. coli*-Stamm auf. Er verbindet die Eigenschaften zweier verschiedener *E. coli*-Pathovaren - der STEC und der EAEC. Wie typische EAEC-Stämme konnte der Ausbruchstamm bislang nicht in der Rinderpopulation nachgewiesen werden, die das Hauptreservoir für STEC darstellt [12, 195, 321]. Zukünftig ist nicht auszuschließen, dass der Ausbruchstamm in Tierpopulationen gelangt, beispielsweise durch Aufnahme von verunreinigtem Wasser [50]. Die Etablierung von Infektketten bei Rindern könnte neben den Virulenzmerkmalen klassischer EAEC vor allem durch das Vermögen zur Bildung von Stx begünstigt werden, das vermutlich für die Etablierung persistenter STEC-Infektionen eine entscheidende Rolle spielt [187]. Zur Beantwortung der Frage, ob der Stamm in der Lage wäre die Speziesbarriere vom Menschen zum Tier zu überwinden, sollte ein etabliertes experimentelles Infektionsmodell [73] genutzt und einerseits die Reaktion des Wirtes auf den Erreger untersucht und andererseits eine quantitative und qualitative Analyse der Erregerausscheidung durchgeführt werden. Im Ergebnis könnte die Gefahr besser abgeschätzt werden, ob sich dieser EHEC-Stamm auch in einem tierischen Reservoir festsetzen kann, und gezielt Maßnahmen zur Vorbeugung einer schwerwiegenden und kausal nicht therapierbaren Erkrankung des Menschen ergriffen werden.

## 5 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere, Geräte, Verbrauchsmaterialien, Nährmedien, Puffer und Chemikalien sind im Anhang (ab Seite 148) aufgelistet.

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Bakterienstämme

**Tab. 2:** *Escherichia coli*- und *Salmonella* sp.-Referenzstämme und deren wichtigste Eigenschaften

Stamm	Serotyp	Pathovar	wichtige Eigenschaften	Herkunft
<b><i>Escherichia coli</i>-Referenzstämme</b>				
123	O43:H28	k.A.	Nal <sup>R</sup>	NADC
86-24 Nal	O157:H7	STEC	<i>stx2a</i> , LEE, Nal <sup>R</sup>	NADC
LB226692	O104:H4	STEC/ EAEC	<i>stx2a</i> , EAEC Virulenz-Plasmid (pAA; 83 kbp; <i>aatA</i> , <i>aggR</i> , <i>aaf/I</i> ), ESBL Resistenz-Plasmid (pESBL; 90 kbp; <i>blaTEM-1</i> , <i>blaCTX-M-15</i> ), Nal <sup>R</sup> , Strep <sup>R</sup> , weiteres Plasmid (1,5 kbp)	IHM
HUSEC041 (01-09591)	O104:H4	STEC/ EAEC	EAEC Virulenz-Plasmid (75 kbp; <i>aatA</i> , <i>aggR</i> , <i>aaf/III</i> ), weiteres Plasmid (95 kbp, <i>blaTEM-1</i> )	IHM
EDL 933	O157:H7	STEC	<i>stx1a</i> , <i>stx2a</i> , LEE	IHIT
2403	Orough:H-	STEC	<i>stx1</i>	IHIT
R27	k.A.	k.A.	Markerplasmid (180 kbp)	IHIT
V517	k.A.	k.A.	Markerplasmide (54 kbp, 5,6 kbp, 5,1 kbp, 3,9 kbp, 3,0 kbp, 2,7 kbp und 2,1 kbp)	IHIT
<b><i>Salmonella</i> sp.-Referenzstamm</b>				
Stm Standard	k.A.	k.A.	Markerplasmid (94 kbp)	IHIT

**Erläuterung:** **EAEC** = enteroaggregative *E. coli*, **ESBL** = *Extended-Spektrum Beta-Laktamase*, **IHIT** = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen, **IHM** = Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster, **k.A.** = keine Angabe, **LEE** = *locus of enterocyte effacement*, **NADC** = National Animal Disease Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, **Nal** = Nalidixinsäure, <sup>R</sup> Resistenz, **STEC** = Shigatoxin-bildende *E. coli*, **Strep** = Streptomycin

## 5.1.2 Primer

**Tab. 3:** Primer-Kombinationen und -Charakteristika für die durchgeführten PCRs

PCR	Primer	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Produktgröße [bp]	Konz. im Primer-Mix [ $\mu$ M]	Ref.
HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR	LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	<i>stx2</i>	584	1,5	[54]
	LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC				
	TerD1	AGTAAAGCAGCTCCGTC AAT	<i>terD</i>	434	2,4	[293]
	TerD2	CCGAACAGCATGGCAGTCT				
	104rfbO-f	TGAACTGATTTT TAGGATGG	<i>rfb<sub>O104</sub></i>	351	3,6	[28]
	104rfbO-r	AGAACCCTCACTCAAATTATG				
	AggRks1	GTATACACAAAAGAAGAAAGC	<i>aggR</i>	254	2,0	[325]
	AggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC				
	fliCH4-a	GGCGAAACTGACGGGTGCTG	<i>fliC<sub>H4</sub></i>	201	2,4	[28]
	fliCH4-b	GCACCAACAGTTACCCGCCG				
	pic_F	CCTGACAGAGGACACGTTCA	<i>pic</i>	146	2,0	[7]
	pic_R	TCAACCCCTGTTCTTCCAAC				
	EAST11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	<i>astA</i>	111	2,5	[324]
	EAST11b	GGTCGGAGTGACGGCTTTGT				
O157-Multiplex-PCR	H7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	<i>fliC<sub>H7</sub></i>	625	2,5	[91]
	H7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC				
	TerD1	AGTAAAGCAGCTCCGTC AAT	<i>terD</i>	434	2,5	[293]
	TerD2	CCGAACAGCATGGCAGTCT				
	MP3-stx2A-F	GTTTTGACCATCTTCGCTGATTATTGAG	<i>stx2</i>	324	2,5	[202]
	MP3-stx2A-R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC				
	O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	<i>rfb<sub>O157</sub></i>	259	2,5	[230]
	O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC				

**Tab. 3** (Fortsetzung)

PCR	Primer	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Produktgröße [bp]	Konz. im Primer-Mix [ $\mu$ M]	Ref.
ESBL-Multiplex-PCR	TEMuF	ATGAGTATTCAACAATTCCG	<i>blaTEM</i>	861	6,0	[106]
	TEMuR	TTAATCAGTGAGGCACCTAT				
	CTX-MuF	CGCTTTGCCGATGTGCAG	<i>blaCTX-M</i>	551	3,0	[229]
	CTX-MuR	ACCGGATATCGTTGGT				
	CTX-M15-F1	ATAAAACCGGCAGCGGTG	<i>blaCTX-M-15</i>	483	3,0	[169]
CTX-M15-F2	GAATTTGACGATCGGGG					
Stx-Multiplex-PCR	MP3-stx2A-F	GTTTTGACCATCTTCGCTGATTATTGAG	<i>stx2</i>	324	5,0	[202]
	MP3-stx2A-R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC				
	MP4-stx1A-F	CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	<i>stx1</i>	244	5,0	[202]
	MP4-stx1A-R	AATGCCACGCTTCCCAGAAATTG				
<i>aggR</i> -PCR	aggR-F	GTATGAAATTAACAACAACATCG	<i>aggR</i>	800	5,0	[37]
	aggR-R	GTTTATTGGCTTTAAAATAGTC				
<i>stx2</i> -Sonden-PCR	MP3-stx2A-F	GTTTTGACCATCTTCGCTGATTATTGAG	<i>stx2</i>	324	-	[202]
	MP3-stx2A-R	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC				
O104-Sonden-PCR	104rfbO-f	TGAACTGATTTTTAGGATGG	<i>rfb<sub>O104</sub></i>	351	-	[28]
	104rfbO-r	AGAACCTCACTCAAATTATG				

### 5.1.3 Antiseren

**Tab. 4:** Antiseren für den Einsatz in der Objektträgerschnellagglutination, Immunhistologie und Verozell-Neutralisationstest

Bezeichnung des Antiserums	Ursprungstierart	Zielantigen	Gebrauchsverdünnung
<i>E. coli</i> O43-Antiserum	Kaninchen	O43 (Stamm 123)	unverdünnt <sup>§</sup>
<i>E. coli</i> OK O157 Antiserum	Kaninchen	O157 (Stamm 86-14 Nal-R)	unverdünnt <sup>§</sup> , 1:4000*
<i>E. coli</i> K9 Antiserum	Kaninchen	K9 (Stamm LB226692)	unverdünnt <sup>§</sup> , 1:8000*
Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörper	Ziege	Kaninchen-IgG (H+L)	1:50*
13IC0006 (Kalb 1847)	Rind	Stx1 (Titer < 30) Stx2 (Titer < 30)	1:10 <sup>#</sup>
12E0097 (Kalb 5934)	Rind	Stx1 (Titer 480) Stx2 (Titer 3840)	1:10 <sup>#</sup>

**Erläuterung:** § Einsatz in der Objektträgerschnellagglutination, \* Einsatz in der Immunhistologie (Verdünnung in BSA/DPBS), # Einsatz im Verozell-Neutralisationstest (Verdünnung in Zellkulturmedium 1)

### 5.1.4 Shigatoxin-Chargen

Die Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Shigatoxin-Chargen (Tab. 5) für den Einsatz im Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) und im Verozell-Neutralisationstest (Vero-NT) ist in Abschnitt 5.3.6 und die Berechnung der zytotoxischen Dosis 50 % in Abschnitt 5.6.2 beschrieben.

**Tab. 5:** Shigatoxin-Chargen für den Einsatz im Verozell-Zytotoxizitätstest und Verozell-Neutralisationstest

Bezeichnung der Charge	<i>E. coli</i> -Stamm	Verdünnung	CD <sub>50</sub> /ml (Verdünnung)	Herkunft
Stx1	2403	1:100	81 CD <sub>50</sub> /ml	eigene Herstellung
rStx2 <sub>WT</sub>	BLR(DE3, pET-24b(+)::stx2)	1:500	83 CD <sub>50</sub> /ml	IHIT

**Erläuterung:** CD<sub>50</sub> = „verozytotoxische Dosis 50 %“, **IHIT** = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen

### 5.1.5 Zelllinie

Zur Überprüfung der Zytotoxizität der verwendeten Toxinpräparationen, sowie zur Bestimmung eines Antikörpertiters gegen Stx wurden Verozellen (interne Bezeichnung: VERO-Gießen; ATCC-Nr.: #CRL 1587) verwendet. Diese adhärente Zelllinie wurde vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen bezogen. Sie stammt ursprünglich von Nierenzellen der Grünen Meerkatze ATCC [11].

## 5.2 Tierexperimentelle Methoden

Die Tierversuche wurden im Friedrich-Loeffler-Institut am Standort Riems durchgeführt. Ein Tierversuchsantrag nach § 8 Tierschutzgesetz mit dem Titel „Experimentelle Infektionen von Kälbern mit *Escherichia coli* O104:H4“ war zuvor vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Abteilung Veterinärdienste, Ernährungswirtschaft und Tierzucht genehmigt worden (Aktenzeichen 7221.3-1.1-093/12).

### 5.2.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen wurden an 87 bis 137 d (Median 113,5 d) alten weiblichen Kälbern der Rasse Holstein Friesian durchgeführt (Tab. 22, Seite 148). Sie wurden von konventionellen landwirtschaftlichen Betrieben zugekauft.

Das Versuchsvorhaben wurde in zwei Teilversuche (TV1 und TV2) gegliedert, wobei TV1 in zwei unabhängigen Durchgängen durchgeführt wurde. Im Teil A des TV1 (TV1A) wurden 3 Kälber mit dem Ausbruchsstamm O104:H4 (Stamm LB226692), und weitere je 3 Kälber mit dem im Kälbermodell gut definierten EHEC O157:H7 Stamm 86-24 Nal (Positivkontrolle) bzw. mit dem bei Rindern nicht-kolonisierenden *E. coli*-Stamm 123 (Negativkontrolle) inokuliert. Die Versuchsdauer betrug 4 d. Der Teil B (TV1B) verlief nach demselben Prinzip wie Teil A, wobei nur 2 Kälber pro Gruppe inokuliert wurden.

Im TV2 wurden je 5 Kälber mit den oben genannten Stämmen inokuliert und über einen Zeitraum von 4 Wochen beobachtet und beprobt.

### 5.2.2 Versuchsdurchführung

Vor Versuchsbeginn (35 d vor bis 1 d nach Einstallung) wurden mindestens 3 an unterschiedlichen Tagen gewonnene Kotproben der Kälber aus der *Ampulla recti* auf Nalidixinsäure-resistente und ESBL-tragende *E. coli* untersucht (Abschnitt 5.3.1). Anhand der Ergebnisse wurden die Kälber in drei Inokulationsgruppen eingeteilt, wobei im TV2 darauf geachtet wurde, die Kälber aus verschiedenen Betrieben gleichmäßig zu verteilen. Ebenso wurden Kotproben der Kälber vom Tag der Einstallung im Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz auf weitere bakterielle Durchfallerreger (*Salmonella* spp., *Yersinia* spp.) und Endoparasiten (*Eimeria* spp., *Trichuris* spp.) getestet. Des Weiteren wurde die coliforme Keimflora der Kotproben (Gassner-Abschwemmung, Abschnitt 5.3.3) von Tag 0 vor Inokulation per Multiplex-PCR auf *stx1*- und *stx2*-Gene, sowie per Monoplex-PCR auf das *aggR*-Gen untersucht (Abschnitt 5.4.2). Die bereits im Aufzuchtbetrieb vorgenommenen prophylaktischen und therapeutischen Behandlungen wurden dokumentiert. Eine weitere Vorbehandlung erfolgte nicht.

Mindestens 7 d vor Inokulation wurden die Tiere zur Eingewöhnung in den Versuchsraum verbracht. Sie erhielten einen Kraftfutter-Mix aus ihrem Herkunftsbestand, Heucobs und hatten freien Zugang zu Selbsttränken. Die jeweiligen Gruppen wurden getrennt in den einzelnen Versuchsräumen frei laufend aufgestellt.

Vor der Inokulation (48 h) wurde den Kälbern das Futter entzogen, Wasser war jedoch weiterhin frei zugänglich. Die Inokulation der Kälber erfolgte intraruminal durch Gabe von  $10^{10}$  KbE des jeweiligen Inokulationsstammes gelöst in 200 ml CASO-Bouillon, welche über ein geschlossenes System mittels Pansensonde verabreicht wurde. Anschließend wurden weitere 200 ml reine CASO-Bouillon appliziert. Direkt im Anschluss erhielten die Tiere wieder Futter.

Alle Kälber wurden beginnend mit dem Tag der Inokulation täglich bis zum Versuchsende klinisch untersucht und die erhobenen Daten protokolliert. Hierzu zählten die Messung der rektalen Körpertemperatur und die mittels eines *scoring*-Systems numerisch bewerteten Parameter der klinischen Untersuchung (Tab. 6).

Im TV1 wurden die Kälber 4 d nach der Inokulation euthanasiert, sezirt und histologische sowie bakteriologische Proben gewonnen. Im TV2 wurden die Kälber 28 d nach der Inokulation per Bolzenschuss betäubt, durch Blutentzug getötet und anschließend bakteriologische Proben gewonnen (Abschnitt 5.5.1, Seite 46).

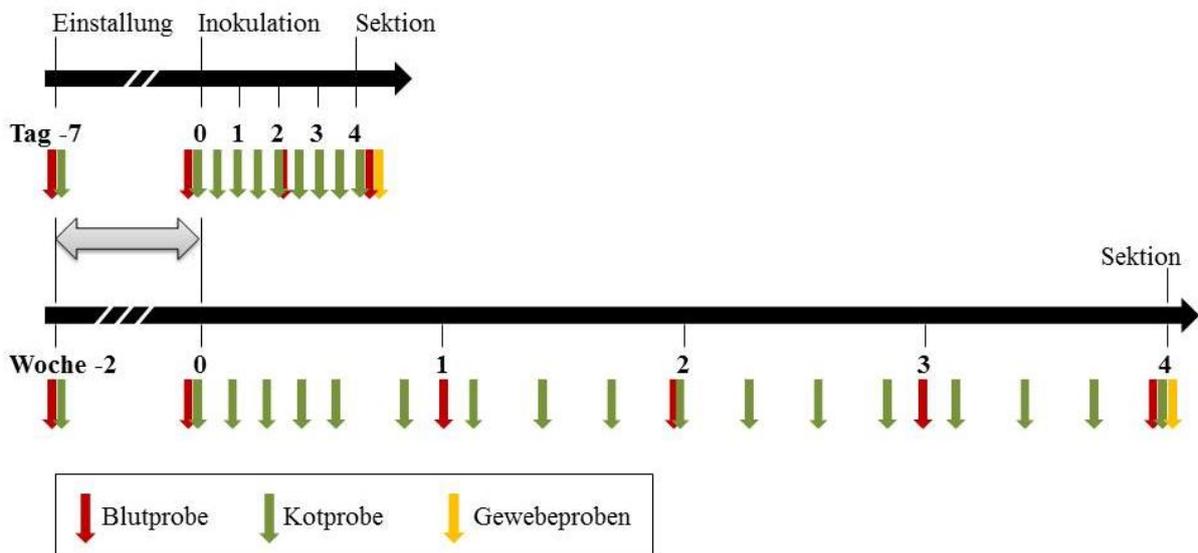
**Tab. 6:** *scoring*-System der klinischen Untersuchung

<b>Untersuchungs- parameter</b>	<b>Score</b>	<b>Klinische Befunde</b>
Appetit	0	normal
	1	lustlos und geringe Futteraufnahme
	2	keine Futteraufnahme
Allgemeinbefinden	0	normal
	1	matt
	2	sehr matt
	3	festliegend
Kotbeschaffenheit	0	normal
	1	breiig
	2	wässriger Durchfall
	3	schleimiger Durchfall
	4	blutiger Durchfall
Hydrationsstatus	0	SH feucht, Bulbi normal, Hautfalte verstreicht sofort
	1	SH pappig, Bulbi normal, Hautfalte verstreicht verzögert
	2	SH trocken, Bulbi eingesunken, Hautfalte verstreicht langsam
	3	SH trocken, Bulbi tief eingesunken, Hautfalte bleibt stehen
Husten	0	kein
	1	gering
	2	mäßig
	3	schwer
Nasenausfluss	0	kein
	1	gering
	2	mäßig
	3	schwer
Augenausfluss	0	kein
	1	gering
	2	mäßig
	3	schwer

**Erläuterung:** SH = Schleimhaut

### 5.2.3 Gewinnung der Blut-, Kot- und Gewebeproben

Während des Versuches wurden in regelmäßigen Abständen Blut- und Kotproben für die Gewinnung von Serum bzw. den bakteriologischen Nachweis der Erregerausscheidung gewonnen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufes und der Probenentnahme in TV1 (oben) und TV2 (unten). grauer Pfeil: Quarantänezeit

#### Blutproben

Die Entnahme von Blut wurde bei den Kälbern durch Punktion der *Vena jugularis* vorgenommen. Das Blut wurde in sterilen 10 ml-Plastikröhrchen mit Serumgerinnungsaktivator aufgefangen, kurz durchschwenkt und nach dem Transport bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Pro Tier und Entnahmezeitpunkt wurden 5 – 10 ml Blut entnommen. Zur Gewinnung von Serum aus den Blutproben wurden diese für 1 – 2 h bei 4 °C gelagert und anschließend abzentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4 °C). Im TV1 erfolgte die Blutprobenentnahme beginnend am Tag der Inokulation (Tag 0) alle 2 Tage, im TV2 einmal pro Woche. Vor der Sektion wurde den Kälbern mithilfe eines Blutentnahmesystems nach Strauß bis zu 500 ml Blut in Vakuumflaschen abgenommen und die Blutproben anschließend über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Das Serum wurde dann mit einer sterilen Plastikpipette abgenommen, in CryoPure 5,0 ml Röhrchen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **Kotproben**

Von allen Kälbern wurde zu jedem Entnahmezeitpunkt ca. 5 – 10 g Kot entnommen. Die Kotproben wurden mit Hilfe eines sterilen Handschuhs manuell aus der *Ampulla recti* entnommen und in einen Urinbecher überführt. Die von den Tieren gewonnenen Kotproben wurden bis zu ihrer Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Im TV1 erfolgte die Kotprobenentnahme beginnend am Tag der Inokulation (Tag 0) zweimal täglich, im TV2 wurden über die ersten 4 Versuchstage täglich und anschließend alle 2 Tage Kotproben entnommen.

### **Gewebeproben**

Im Rahmen der Sektion wurden von jedem Kalb Darminhalts- und Darmgewebeproben für (a) die KbE-Bestimmung in den verschiedenen Darmabschnitten (Abschnitt 5.3.3) und für (b) histologische Untersuchungen (Abschnitt 5.5), gewonnen. Die genauen Entnahmelokalisationen sind in Tab. 11 (Seite 48) aufgeführt.

## **5.3 Bakteriologische Methoden**

### **5.3.1 Fäkale Ausscheidung Antibiotika-resistenter, coliformer Keime**

Vor Versuchsbeginn wurden Kotproben der Kälber auf Nalidixinsäure-resistente und ESBL-tragende *E. coli* untersucht. Dazu wurde jede Kotproben nach der Zustellung (Postweg) direkt per Dreiösenausstrich auf MacConkey-Agar-Nal (50 µg/ml) und BRILLIANCE ESBL Agar ausgestrichen. Das Wachstum coliformer Keime wurde für jedes Selektivnährmedium einzeln nach einem *scoring*-System (Tab. 7) bewertet. Im Anschluss wurden die Kälber entsprechend in die drei Inokulationsgruppen aufgeteilt. Diese Zuteilung erfolgte danach, dass die Kälber einer Inokulationsgruppe zu allen 3 Beprobungszeitpunkten auf dem jeweiligen homologen Selektivnährmedium (Tab. 8) nur bis zu einem Score von (+) resistente coliforme Keime aufweisen durften. Parallelansätze auf Blutagar, Gassner-Agar und MacCONKEY-Agar wurden ebenso auf Keimwachstum kontrolliert und dienten somit als Positivkontrolle.

**Tab. 7:** Untersuchung der Kotproben auf Nalidixinsäure-resistente und ESBL-tragende *E. coli*

Score	Wachstum auf dem Selektivnährmedium	Zuteilung zu entsprechender Inokulationsgruppe
-	keine Wachstum coliformer Keime	ja
(-)	nur wenige coliforme Einzelkolonien (<10)	ja
(+)	Wachstum coliformer Keime in der 1. Verdünnungsstufe	ja
+	Wachstum coliformer Keime bis zur 2. Verdünnungsstufe	nein
++	Wachstum coliformer Keime bis zur 3. Verdünnungsstufe	nein

### 5.3.2 Herstellung und Testung der Inokulationssuspensionen

Zur Herstellung der Inokulationssuspension mit  $10^{10}$  KbE wurden die *E. coli*-Stämme auf dem entsprechenden Selektivnährmedium (Tab. 8) in einer Übernachtskultur angezüchtet. Am nächsten Tag wurden 3 bis 5 Kolonien in 50 ml des Anzuchtnährmediums (Tab. 8) in 250 ml-Schott-Flaschen überimpft und inkubiert (18 h, 37 °C, schüttelnd). Anschließend wurden die Kulturen in 50 ml-Plastikgefäße überführt und zentrifugiert (20 min, 4000 x g, RT), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 2,5 ml CASOB-Glycerol-Lösung resuspendiert. Je 1 ml der Inokulationssuspension wurde in Kryo-Röhrchen aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren und gelagert.

**Tab. 8:** Nährmedien zur Bakterienanzucht

Stamm	Anzucht-nährmedium	Selektiv-nährmedium	Kolonie-morphologie	Bestätigungstests nach Reisolierung
123	CASO-Bouillon mit 50 µg/ml Nalidixinsäure	MacConkey-Agar-Nal (50 µg/ml)	große rote Kolonien mit trübem Hof	Koloniemorphologie, OSA
86-24 Nal	CASO-Bouillon mit 50 µg/ml Nalidixinsäure	MacConkey-Agar-Nal (50 µg/ml)	große rote Kolonien mit trübem Hof	Koloniemorphologie, OSA, Multiplex-PCR
LB226692	CASO-Bouillon mit 20 µg/ml Nalidixinsäure	BRILLIANCE ESBL Agar	dunkelblaue Kolonien, glatter oder leicht ausgefranster Rand	Koloniemorphologie, OSA, Multiplex-PCR

**Erläuterung:** Nal = Nalidixinsäure, OSA = Objektträgerschnellagglutination

Die Bestimmung der Keimzahl nach dem Auftauen erfolgte durch das Anlegen einer log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe in PBS-Puffer<sup>A</sup> über acht Verdünnungsstufen (je Stufe 100 µl verdünnte Keimsuspension plus 900 µl PBS-Puffer<sup>A</sup>). Von den Verdünnungsstufen 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-8</sup> wurden 100 µl auf die entsprechenden Selektivnährmedien (Tab. 8) gegeben, mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und inkubiert (18 ± 2 h, 37 °C, aerob). Zur Keimzählung wurde die Platte der Verdünnungsreihe ausgewählt, auf der zirka 30 - 300 deutlich abgesetzte Einzelkolonien identifiziert werden konnten. Die Keimzahl in KbE pro ml Inokulationssuspension wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = \text{Anzahl Kolonien} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 10^1$$

Anschließend wurde anhand der Keimzahl die benötigte Menge an Inokulationssuspension berechnet um eine Dosis von 10<sup>10</sup> KbE pro Tier zu erreichen.

Die Kulturen wurden außerdem auf Reinheit, sowie die Kolonien in ihrer Morphologie beurteilt. Mit der Multiplex-PCR (Abschnitt 5.4.2) wurden außerdem die stammspezifischen Virulenzgenprofile überprüft.

### 5.3.3 Anzüchtung und Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgte aus Kot-, Darmgewebs- und Darminhaltsproben. Hierfür wurden die Proben unterschiedlich vorbereitet. Die Durchführung der Gesamtkeimzahlbestimmung erfolgt dann für alle Probenmaterialien in gleicher Weise.

Bei festem Probenmaterial (Darmgewebe) wurde 1 g abgewogen, mit einer Schere grob zerkleinert, in einen Homogenisationsbeutel mit 9 ml PBS-Puffer<sup>A</sup> gegeben und homogenisiert (Stomacher, 6 min, max. 4 Beutel pro Durchgang). Bei den Kot- und Darminhaltsproben wurde ebenfalls 1 g einwogen, in ein 15 ml-Plastikgefäß überführt und mit 9 ml PBS-Puffer<sup>A</sup> auf dem Vortexer homogenisiert. Aus den Probensuspensionen wurde anschließend eine log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-5</sup> in PBS-Puffer<sup>A</sup> erstellt (je Stufe 100 µl verdünnte Keimsuspension plus 900 µl PBS-Puffer<sup>A</sup>). Anschließend wurden 100 µl aus der ersten Verdünnungsstufe entnommen und auf einer Gassner-Agarplatte mit einem Spatel ausplattiert. Weitere 100 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf dem Selektivnährmedium für den entsprechenden Stamm ausplattieren (Tab. 8). Die Platten wurden bei 37 °C 18 ± 2 h aerob im Brutschrank inkubiert.

Die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten pro Gramm Probe (KbE/g Probe) erfolgte wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Die Nachweisgrenze lag bei  $10^2$  KbE/g Probe. Die Kulturen wurden außerdem auf Reinheit, sowie die Kolonien in ihrer Morphologie beurteilt. Die ausgezählten Platten wurden dann der Koloniehybridisierung zugeführt.

Von jeder Kot- und Darminhaltsprobe wurden zudem 0,5 g Probenmaterial eingewogen, in ein 15 ml-Plastikgefäß überführt und mit 5 ml CASO-Bouillon auf dem Vortexer gut gemischt. Diese Keimsuspension wurde für 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Falls kein Wachstum auf dem Selektivnährmedium in der ersten Verdünnungsstufe nachzuweisen war, wurden 100 µl dieser Voranreicherung auf dem Selektivnährmedium des entsprechenden Stammes ausgestrichen, inkubiert (37 °C,  $18 \pm 2$  h) und auf Bakterienwachstum kontrolliert. Die Platten wurden entweder als Keimwachstum-positiv oder -negativ bewertet, jedoch die Koloniezahl nicht erfasst. Zur Datenanalyse wurde positiven Platten ein Wert von 10 KbE/g Probe, negativen Platten ein Wert von 1 KbE/g Probe zugewiesen [118].

Nach Abschluss der Keimzahlbestimmung wurden die Gassner-Agarplatte sowie die  $10^{-1}$ -Verdünnungsstufe des Selektivnährmediums mit 1,5 ml Nährbouillon mit 30 % Glycerin abgeschwemmt, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert. Falls diese Verdünnungsstufe nicht zur Verfügung stand (Einsatz in Koloniehybridisierung, kein Wachstum) wurde alternativ eine nachfolgende Verdünnungsstufe oder das Selektivnährmedium der Voranreicherung abgeschwemmt. Diese Abschwemmungen dienten zur Archivierung des gewonnenen Keimspektrums, sowie falls nötig für den Einsatz in der PCR.

#### **5.3.4 Anzucht zur Resistenzbestimmung**

Zur Isolierung und Untersuchung einzelner *E. coli* O104:H4-Re-Isolate im Hinblick auf deren Resistenzeigenschaften, speziell der Stabilität des ESBL-Plasmides, wurde eine log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe in PBS-Puffer<sup>A</sup> bis zu einer Verdünnung von  $10^{-6}$  aus der Gassner-Abschwemmung der Kotproben angelegt und auf MacConkey-Agarplatten mit 20 µg/ml Nalidixinsäure ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C  $18 \pm 2$  h aerob im Brutschrank inkubiert. Für das weitere Vorgehen (Koloniehybridisierung) wurde die Verdünnungsstufe ausgewählt, auf der zirka 30 bis 300 deutlich abgesetzte Einzelkolonien identifiziert werden konnten. Die Kulturen wurden außerdem auf ihre Reinheit, sowie die Kolonien in ihrer Morphologie beurteilt.

Nach der Identifizierung und Isolierung O104-positiver Einzelkolonien per Koloniehybridisierung (Abschnitt 5.4.1) wurden diese zur phänotypischen Bestimmung der ESBL-Resistenz auf dem BRILLIANCE ESBL Agar angezüchtet. Dazu wurden jeweils 5 µl der in der Stammhaltung archivierten Glycerinkultur auf den Agar in einem Rasterverfahren aufgetropft und bei 37 °C  $18 \pm 2$  h aerob im Brutschrank inkubiert. Als positiv für ein Wachstum auf ESBL-Agar wurden Kolonien bewertet, die wie die Positivkontrolle (Stamm LB226692) einen runden, klar abgegrenzten, erhabenen und am Rand abfallenden dunkelblauen Bakterienrasen aufwiesen. Als Negativkontrolle wurden die Stämme 86-24 Nal und der Stamm 123 parallel mit aufgetropft.

### **5.3.5 Objektträgerschnellagglutination (OSA)**

Zur Bestätigung von morphologisch typischen Kolonien der entsprechenden Inokulationsstämme (min. 1 Kolonie pro Beprobungszeitpunkt) wurden zirka 10 µl unverdünntes spezifisches Antiserum (Tab. 4) auf einem Objektträger mit einer kleinen Öse Koloniematerial verrieben und unter Schwenken das Agglutinationsverhalten beurteilt. Als positiv wurde angesehen, wenn das Koloniematerial und das Antiserum Agglutinate bildeten. Negativ beurteilt wurde die homogene Vermischung des Serums mit dem Koloniematerial ohne Agglutinatbildung. Spontanagglutinationen wurde durch einen Parallelansatz mit PBS-Puffer<sup>A</sup> anstelle des Antiserums ausgeschlossen.

### **5.3.6 Herstellung von Periplasma-Fraktionen (Polymyxin B-Präparation)**

Die Gewinnung von Stx1-enhaltenden Lösungen für den Einsatz im Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT) und -Neutralisationstest (Vero-NT) erfolgte durch Periplasma-Präparationen aus dem STEC-Stamm 2403. Dazu sind einige Kolonien des Stammes von Blut-Agar-Platten in 20 ml CASO-Bouillon überimpft und in 50 ml-Plastikgefäßen für 18 h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert worden. Die Kulturen wurden anschließend zentrifugiert (30 min, 3290 x g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 1,8 ml Polymyxin B-Lösung resuspendiert. Nach der Inkubation der Suspension für 45 min bei 37 °C und 180 U/min wurde der Zentrifugationsschritt (s.o.) wiederholt, der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein 2 ml Plastik-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 13000 U/min, RT). Anschließend wurde nochmals der Überstand vorsichtig abpipettiert und aliquotiert. Die Lagerung der Lysate erfolgte bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -80 °C.

Für Stx1-Vero-NTs wurde das Stx1a aus dem STEC-Stamm 2403 wie oben beschrieben gewonnen. Für Stx2-Vero-NTs wurde rekombinant hergestelltes Stx2a (rStx2<sub>WT</sub>) verwendet, welches analog im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen aus dem Stamm BLR(DE3, pET-24b(+):*stx2*) hergestellt worden war. Dieses induzierte ebenso wie die hergestellten Stx1-Lösungen die für Stx typischen zytopathischen Effekte auf Verozellen, die mit zunehmender Verdünnung nachliessen [155]. Zur Bestimmung der verozytotoxischen Dosis 50 % (CD<sub>50</sub>) wurden die hergestellten Polymyxin B-Lysate anschließend im Vero-ZT eingesetzt.

## 5.4 Molekularbiologische Methoden

### 5.4.1 Koloniehybridisierung

Zur Isolierung von *stx2*- bzw. *rfb*<sub>O104</sub>-positiven Einzelkolonien aus verschiedenen Probenmaterialien wurden Koloniehybridisierungen modifiziert nach GEUE et. al [97] durchgeführt. Hierfür wurden die ausgezählte Agar-Platte mit 30 bis 300 Einzelkolonien aus der Gesamtkeimzahl-Bestimmung für 30 min bei 4 °C kühl gestellt. Anschließend wurden die Nylonmembran und die Agar-Platte gekennzeichnet, die Nylonmembran für zirka 1 min luftblasenfrei auf die Agar-Platte aufgelegt und dann vorsichtig abgenommen. Die Agar-Platte wurde als Masterplatte bei 4 °C aufbewahrt.

Die Kolonien wurden durch Auflegen der Nylonmembran mit den Kolonien nach oben auf ein mit Denaturierungslösung durchtränktes Vlies denaturiert (15 min, RT), anschließend auf ein mit Neutralisierungslösung durchtränktes Vlies aufgelegt (15 min, RT) und abschließend auf einem Vlies mit 2x SSC (10 min, RT) durchtränkt. Nach dem Trocknen der Nylonmembran (mindestens 30 min, RT), wurde die Nylonmembran zur Fixierung der DNS bei 80 °C für 60 min gebacken. Nach der Fixierung der DNS wurde die Nylonmembran erneut mit den Kolonien nach oben auf ein mit 2x SSC getränktes Vlies aufgelegt (10 min, RT). Parallel dazu wurden 1,375 ml frisch hergestellte Proteinase K-Lösung in eine Petrischale mit Deckel gegeben und anschließend die Nylonmembran mit Kolonien nach unten eingelegt und lichtgeschützt inkubiert (60 min, 37 °C). Noch vorhandene Proteinreste wurden nach der Proteinase-K-Behandlung durch Abrollen der Nylonmembranen auf Filterpapier entfernt.

Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden die Nylonmembranen in Glasröhren verbracht und mit 8 ml auf 42 °C vorgewärmter DIG Easy Hyb-Lösung äquilibriert (60 min, 42 °C rotierend). Nach Abgießen der DIG Easy Hyb-Lösung wurden 8 ml der jeweiligen

Hybridisierungslösung (Abschnitt 5.4.2) in die Glasröhren gegeben und inkubiert (42 °C, über Nacht, rotierend). Nach der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung aufgefangen, eingefroren und bis zu viermal wiederverwendet. Die Nylonmembranen wurden verschiedenen Waschsritten unterzogen. Zuerst erfolgte die zweimalige Waschung mit je 5 ml 2x SSC/0,1 % SDS (je 5 min, RT, rotierend). Danach wurden die Membranen zweimal mit 5 ml 0,5x SSC/0,1 % SDS gewaschen (je 15 min, 68 °C, rotierend). Anschließend wurde die Nylonmembran mit den Kolonien nach oben in Petrischalen überführt und in zirka 8 ml 1x Waschpuffer unter Wippen auf einem Plattformschüttler inkubiert (5 min, RT).

Für die Blockierung wurden die Membranen in 6 ml 1x Blockpuffer inkubiert (60 min, RT, wippend). Zur Detektion wurde der Nylonmembran zuerst 6 ml Konjugatlösung hinzugegeben (30 min, RT, wippend) und anschließend die Membran zweimal mit 8 ml 1x Waschpuffer gewaschen (je 15 min, RT, wippend). Danach erfolgte die Äquibrierung mit 5,5 ml 1x Detektionspuffer (5 min, RT, wippend). Für die Färbung wurde 5,5 ml Substratlösung in eine neue Petrischale gegeben, die Nylonmembran mit den Kolonien nach unten eingelegt und inkubiert (2 h, RT, lichtgeschützt). Im Anschluss wurde das Substrat abgegossen und die Farbreaktion durch dreimaliges Waschen mit *A. dest.* gestoppt. Die Nylonmembran blieb bis zur vollständigen Trocknung offen liegen.

Bei der Auswertung der Nylonmembranen wurden deutlich violett gefärbte Kolonien als *stx2*- bzw. *rfb<sub>O104</sub>*-positiv bewertet. Diese wurden den Originalkolonien auf den Masterplatten zugeordnet und der absolute Anteil bestimmt. Von den Masterplatten wurden, falls vorhanden, mindestens 5 bzw. 10 positive und 5 negative Kolonien gepickt, in je 700 µl Nährbouillon in einem 1,5 ml Plastik-Reaktionsgefäß über Nacht bei 37 °C angezüchtet und nach einer Wachstumskontrolle und der Zugabe von 300 µl Glycerin in die Stammhaltung bei -80 °C überführt.

### 5.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### **Herstellung von Gensonden für die DNS-DNS-Hybridisierung mittels PCR**

Für die Koloniehybridisierung wurden Digoxigenin (DIG)-markierte Gensonden für das *stx2*- und das *rfb<sub>O104</sub>*-Gen hergestellt. Verwendet wurden hierfür die Primer-Paare MP3-*stx2A-F* und MP3-*stx2A-R* bzw. 104*rfbO-f* und 104*rfbO-r* (Tab. 3), als Matrize dienten die *E. coli*-Stämme EDL 933 bzw. LB226692. Die PCR wurde nach Vorgaben des Herstellers mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit durchgeführt. Die Kontrolle der erfolgreichen Markierung

und Amplifikation der Genfragmente erfolgte mittels TBE-Agarosegelelektrophorese in 2 %igen Gelen und mittels Koloniehybridisierung unter Verwendung von Kolonien definiert *stx2*-positiver und -negativer bzw. *rfb*<sub>O104</sub>-positiver und -negativer *E. coli*-Stämme.

Für die Verwendung in der Koloniehybridisierung wurden 16 µl markierte DNS-Sonde mit 8 ml DIG Easy Hyb-Lösung gemischt („Hybridisierungslösung“). Diese wurde bei Erstgebrauch für 10 min bei 100 °C denaturiert und danach sofort für 5 min in den Kühlschrank gestellt. Bei wiederholter Nutzung (bis zu viermal) erfolgte die Denaturierung für 10 min bei 65 °C vor der Verwendung.

### **Mono- und Multiplex-PCRs**

Die Charakterisierung von Einzelkolonien, sowie die Schnelltestung auf bestimmte Merkmale der Inokulationsstämme in der Gassner- und Selektivmedium-Abschwemmung erfolgten entweder per Mono- oder per Multiplex-PCR. Dafür wurden von Glycerinkulturen archivierter Einzelkolonien bzw. von Abschwemmungen jeweils 100 µl in ein 1,5 ml *safe lock* Plastik-Reaktionsgefäß aliquotiert, 10 min bei 100 °C inaktiviert und bei -20 °C gelagert. Jeweils 3 µl dieser Lösung wurde als Ausgangsmaterial in die Multiplex-PCR eingesetzt.

Für die Identifikation der O104:H4-Isolate wurde eine modifizierte HUSEC041-Multiplex-PCR [28, 150], für die Identifikation der O157:H7-Isolate eine O157-Multiplex-PCR eingesetzt. Der Nachweis einer *Extended-Spektrum Beta-Laktamase* (ESBL) vom Typ CTX-M-15 mit der vorgelagerten Insertionssequenz ISEcp1 und der Beta-Laktamase des Typs TEM-1 erfolgte über eine ESBL-Multiplex-PCR, der Nachweis von *stx1* und *stx2* erfolgte über eine weitere Multiplex-PCR. Für den Nachweis von *aggR* wurde eine Monoplex-PCR eingesetzt.

Alle verwendeten Primer (Tab. 3) wurden bei der Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg hergestellt. Sie wurden mit *A. dest.* auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bei -20 °C gelagert. Sowohl für die Verwendung in einer Mono- wie auch in einer Multiplex-PCR wurde vorab jeweils ein Primer-Mix hergestellt, in dem die Primer in einer Konzentration zwischen 1,5 und 6,0 µM in *A. dest.* vorlagen. Die Primer-Mix-Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Ein PCR-Reaktionsansatz (30 µl) enthielt die in Tab. 9 aufgeführten Reagenzien, sowie 3 µl der wie beschrieben aufbereiteten Probe.

**Tab. 9:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der PCRs

Reagenz	Menge/ Testansatz	Stamm- Konzentration	Endkonzentration im Testansatz
<i>Aqua destillata</i>	18,6 µl	-	-
NH <sub>4</sub> Mix	3,0 µl	10 x	1 x
MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl	50 mM	2 mM
Primer-Mix	3,0 µl	1,5 bis 3,6 µM (je Primer)	150 bis 360 nM (je Primer)
dNTP	1,0 µl	4 mM (je Nukleotid)	133 µM (je Nukleotid)
PANScript Polymerase	0,2 µl	5 U/µl	1 U
Hitzelysat	3,0 µl	-	-

Als Positivkontrolle dienten bei der HUSEC041/EAEC-, der ESBL-Multiplex-PCR und der *aggR*-PCR der *E. coli*-Stamm LB226692 (O104:H4) sowie der *E. coli*-Stamm HUSEC041 (01-09591; O104:H4), bei der O157-Multiplex-PCR der *E. coli*-Stamm 86-24 Nal (O157:H7) und bei der Stx-Multiplex-PCR der *E. coli*-Stamm EDL 933. Von diesen wurde eine für 24 h bei 37 °C in Nährbouillon inkubierte Kultur angelegt, welche anschließend für 10 min bei 100 °C denaturiert und dann in die PCR eingesetzt wurde („Hitzelysat“). Nährbouillon (für subkultivierte Einzelkolonien) bzw. Nährbouillon mit 30 % Glycerin (für Abschwemmungen) anstatt der Hitzelysate dienten als Negativkontrolle. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils mit den aufgeführten Parametern (Tab. 10) im Thermocycler durchgeführt.

**Tab. 10** Temperaturprofil für die Amplifikation im Thermocycler

Zyklus	Denaturierung	Anlagerung	Verlängerung
1.	95 °C – 60 sek	-	-
2. – 36.	95 °C – 30 sek	55 °C – 60 sek	72 °C – 60 sek
37.	-	-	72 °C – 5 min
52.	-	-	4 °C – ∞

Als O157:H7-positiv wurden Isolate angesehen, bei denen alle vier Amplifikate (*fliC<sub>H7</sub>*, *terD*, *stx2*, *rfb<sub>O157</sub>*) der O157-Multiplex-PCR detektiert wurden. Die Bestätigung einzelner Kolonien als Ausbruchstamm-Isolate galt als erbracht, wenn vier Amplifikate in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR detektiert wurden (*stx2*, *terD*, *rfb<sub>O104</sub>*, *fliC<sub>H4</sub>*), sowie drei

Amplifikate in der ESBL-Multiplex-PCR (*blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaCTX-M-15*). Der Nachweis von *stx1*, *stx2* und *aggR* galt als erbracht, wenn die jeweiligen einzelnen Amplifikate detektiert wurden.

### 5.4.3 Präparation von Plasmid-DNS

Zur Analyse von Plasmidprofilen wurde Plasmid-DNS nach dem modifizierten Verfahren von KADO & LIU [141] präpariert. Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml Nährbouillon überimpft und über 16 h bei 37 °C schüttelnd (180 U/min) inkubiert. Von der Kultur wurden 1,5 ml am nächsten Tag in ein steriles *safe lock* Plastik-Reaktionsgefäß überführt, 10 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (4 min, 13200 U/min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 100 µl frisch angesetztem Lysepuffer versetzt. Nach 25 min Inkubation bei 58 °C wurde die Lösung mit 100 µl des Phenol-Chloroform-Gemisches homogen gemischt. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 U/min, RT) wurden 90 µl des wässrigen Überstandes mit der aufgereinigten Plasmid-DNS in ein neues Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Plasmid-DNS-Präparationen der *E. coli*-Stämme LB226692 und HUSEC041 (01-09591) wurden als Positivkontrolle mitgeführt. Die Plasmide der *E. coli*-Stämme V517 und R27, sowie von dem *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhimurium-Stamm Stm Standard wurden zur Größenabschätzung als Standard mitgeführt.

Als Ausbruchsstamm O104:H4-verdächtig galten Proben, bei denen ein 90 kbp Resistenz-Plasmid und ein 83 kbp EAEC Virulenz-Plasmid detektiert werden konnten. Der Stamm LB226692 enthält noch ein drittes Plasmid von ca 1,5 kbp Größe [247], welches jedoch in dieser Auftrennung nicht abgebildet wird.

### 5.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von PCR-Amplifikaten oder Plasmid-DNS erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Als Laufpuffer wurde bei PCR-Amplifikaten 1x TBE und eine Agarosekonzentration von 2 % verwendet. Es wurde eine Spannung von ca. 6 V/cm Elektrodenabstand für 1 h angelegt. Die TBE-Gele wurden vor dem Gießen mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid-Gebrauchslösung versetzt. Der Probenauftrag erfolgte durch Mischen des PCR-Ansatzes mit 2 µl Lade-puffer. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus mitgeführt. Zur Auftrennung von Plasmid-DNS wurde ein Aliquot des DNS-Präparates 4:1 (v/v) mit Lade-puffer versetzt und hiervon 10 µl auf ein 0,5%iges

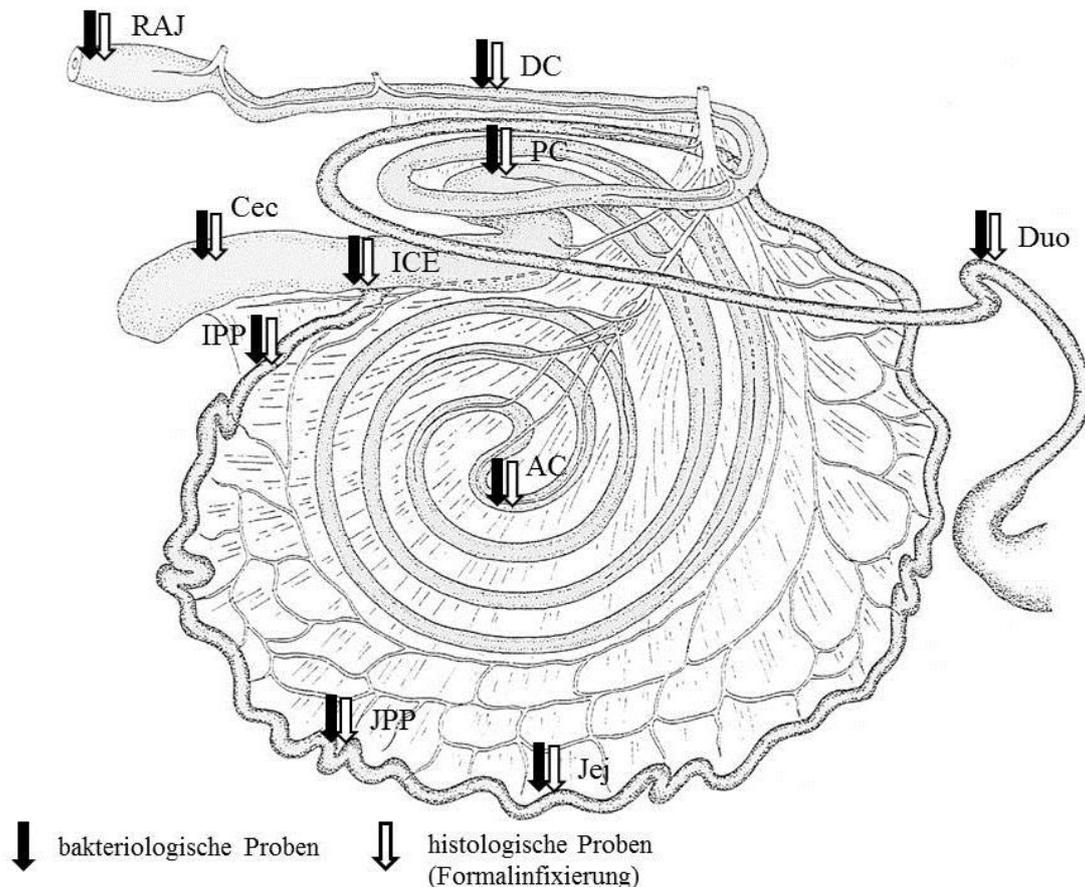
TAE-Agarosegel in 1x TAE aufgetragen. An das TAE-Gel wurde für ca. 18 h eine Spannung von 2,5 V/cm Laufstrecke angelegt und anschließend die Plasmid-DNS durch Einlegen des Gels in ein Ethidiumbromidbad (0,4 µg/ml) angefärbt (30 min, RT) und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Sichtbarmachung der im elektrischen Feld aufgetrennten DNS-Fragmente erfolgte mit UV-Licht im Geldokumentationssystem.

### 5.5 Histologische Methoden

#### 5.5.1 Euthanasie, Sektion, makroskopische Beurteilung und Probennahme

Am Ende des TV1 wurden die Tiere euthanasiert und sezirt und dabei histologische und bakteriologische Proben gewonnen. Hierzu wurde das jeweilige Tier mit Xylazin (0,2 mg/kg LM, i.v.) und Ketamin (2,5 mg/kg LM, i.v.) in einer Mischspritze, sowie Diazepam (0,5 mg/kg LM, i.v.) betäubt. Die Narkose wurde durch intravenöse Gabe von Ketamin, welches nach Wirkung dosiert wurde, aufrechterhalten. Sobald sich das Tier in tiefer Narkose befand, wurde die Bauchhöhle durch Inzision eröffnet und das Darmkonvolut vorgelagert. An definierten Abschnitten (Abb. 2) wurden Darmschlingen abgebunden und die für die histologische Aufarbeitung vorgesehenen Abschnitte mit neutral gepufferten Formalin nach Lillie (4 %ig, NBF) als Fixierlösung gefüllt. Diese Vorfixierung während der Narkose war notwendig, um die unmittelbar nach der Euthanasie eintretenden Veränderungen der Darmschleimhaut vor allem im Bereich der Zotten zu verhindern. Sobald diese Präparation abgeschlossen war, wurden die Tiere mit Pentobarbital-Natrium (50 - 100 mg/kg LM, i.v.) euthanasiert. Die Feststellung des Todes erfolgte nach dem Sistieren von Atem- und Herztätigkeit, dem Erlöschen des Lid- und Kornealreflexes und der maximalen Weitstellung der Pupillen.

Nach der Tötung wurde der Darm distal des Pylorus und im Colon descendens doppelt ligiert, durchtrennt und das Darmkonvolut *in toto* aus dem Tierkörper entfernt. Der Darm wurde am Mesenterium abgetrennt, auf dem Tisch ausgelegt und die Länge des Dün- und Dickdarms ausgemessen. Anschließend wurden die in Tab. 11 aufgeführten Gewebeproben zur Fixierung in Formalin gewonnen und die für die Fixierung in Formalin mit NBF gefüllten Darmschlingen herausgeschnitten. Die abgebundenen Darmabschnitte wurden eröffnet, durch Stecknadeln mit der Schleimhaut nach oben auf Styroporplatten gespannt und mit der Schleimhauseite nach unten in NBF gelegt. Die anderen Organproben wurden auf eine Dicke von max. 1,5 cm zurechtgeschnitten und in NBF verbracht. Die Fixierung erfolgte für 24 – 48 Stunden bei Raumtemperatur.



**Abb. 2: Darstellung der Entnahmestellen der Darmproben im TV1**  
(modifiziert aus SALOMON *et al.*, 2005, Seite 296 [252])  
**AC** = *Ansa centralis*, **Cec** = Zäkum, **DC** = distales Kolon, **Duo** = Duodenum,  
**ICE** = Ileozäkalklappe, **IPP** = Peyer-Platten des *Ileums*, **Jej** = Jejunum, **JPP** =  
Peyer-Platten des *Jejunums*, **PC** = proximales Kolon, **TV** = Teilversuch,  
**RAJ** = *rectoanal junction*

Des Weiteren wurden jeweils zirka 5 cm lange Darmabschnitte für die mikrobiologische Untersuchung (Abschnitt 5.3.3) gewonnen und in sterile Einweggefäße verbracht. Die Entnahmestellen sind in Abb. 2 dargestellt. Der Darm wurde makroskopisch von außen begutachtet, in seiner gesamten Länge eröffnet und der Darminhalt nach Farbe und Konsistenz sowie die Darmschleimhaut nach ihrer Oberfläche deskriptiv beurteilt. Anschließend wurde eine ausführliche Sektion und makroskopische Beurteilung des Tierkörpers durchgeführt.

Am Ende des TV2 wurden die Kälber per Bolzenschuss betäubt, durch Blutentzug getötet und anschließend bakteriologische Proben gewonnen. Die Feststellung des Todes erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Tötung wurde der Darm wie für den TV1 beschrieben *in toto* aus dem Tierkörper entfernt und am Mesenterium abgetrennt auf dem Tisch ausgelegt. An

definierten Abschnitten (Abb. 2) wurden jeweils zirka 5 cm lange Darmabschnitte für die mikrobiologische Untersuchung an beiden Seiten doppelt ligiert, anschließend kontaminationsfrei gewonnen und in sterile Einweggefäße verbracht. Anschließend wurde eine makroskopische Beurteilung des Tierkörpers durchgeführt. Die Gewinnung von histologischen Proben erfolgte im TV2 nicht.

**Tab. 11:** Übersicht über die Probenentnahme bei der Sektion

Lokalisationen			Mikrobiologische Untersuchung		
Nr.	Organ	Abkürzung	NBF-fixiertes Gewebe	Gewebe	Inhalt
1	<i>Duodenum</i>	Duo	+ <sup>1</sup>	+	-
2	Mittleres <i>Jejunum</i>	Jej	+ <sup>1</sup>	+	-
3	Peyer-Platten des <i>Jejunums</i>	JPP	+ <sup>1</sup>	+	-
4	Peyer-Platten des <i>Ileums</i>	IPP	+ <sup>1</sup>	+	-
5	Ileozäkalklappe	ICE	+ <sup>1</sup>	+	-
6	Zäkum	Cec	+ <sup>1</sup>	+	-
7	proximales Kolon	PC	+ <sup>1</sup>	+	+
8	<i>Ansa centralis</i>	AC	+ <sup>1</sup>	+	-
9	distales Kolon	DC	+ <sup>1</sup>	+	-
10	Rektum / <i>rectoanal junction</i>	RAJ	+ <sup>1</sup>	+	+
11	Pansen	Pans	+ <sup>1</sup>	-	+ <sup>1</sup>
12	<i>Abomasum</i>	Abo	+ <sup>1</sup>	+	+ <sup>1</sup>
13	Gallenblase	GB	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+
14	<i>Lymphonodus jejunalis</i>	Mes-LN	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-
15	<i>Lymphonodus cecalis</i>	ICE-LN	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-
16	<i>Lymphonodus popliteus</i>	P-LN	+ <sup>1</sup>	-	-
17	Tonsille	Tons	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-
18	Leber	Le	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-
19	Milz	Mi	+ <sup>1</sup>	-	-
20	Niere	Ni	+ <sup>1</sup>	-	-
21	Lunge	Lu	+ <sup>1</sup>	-	-
22	Herz	He	+ <sup>1</sup>	-	-

**Erläuterung:** +: Probe entnommen, +<sup>1</sup>: Probe nur in TV1 entnommen, -: Probe nicht entnommen, **NBF** = neutral gepuffertes Formalin nach Lillie (4 %ig)

### 5.5.2 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Zunächst wurden aus den fixierten Darmabschnitten jeweils 2 und von den übrigen Organen jeweils 1 repräsentative(s) Stück(e) von 3 – 5 mm herausgeschnitten, in Einbettungskassetten gelegt und 1 Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült. Im Gewebeeinbettungsautomaten erfolgte eine Entwässerung der Präparate und Infiltration mit Paraffin Typ 1. Anschließend wurden die Proben an der Paraffinausgießstation in Paraffin Typ 6 eingebettet. Von den eingebetteten Präparaten wurden mittels eines Rotationsmikrotoms 2 µm dicke Schnitte hergestellt, auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger bzw. Adhäsionsobjektträger (für die Immunhistologie) aufgezogen und bei 37 °C getrocknet. Die an der RAJ und ICE gewonnenen Gewebeproben der mit den Stämmen 86-24 Nal und LB226692 inokulierten Tiere wurden vollständig aufgeschnitten und in Paraffin eingebettet.

### 5.5.3 Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung der Schnitte

Vor der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert. Hierzu wurden sie zuerst für 30 min bei 60 °C zum Ablauen des Paraffins gelagert und anschließend in Reagenzien zunehmender Hydrophilie eingetaucht (Tab. 12).

**Tab. 12:** Alkoholreihe zur Entparaffinierung von Paraffinschnitten

Reagenzien	HE-Färbung		IH-Färbung	
	Dauer	Durchführung	Dauer	Durchführung
Xylol	je 2 min	2mal	je 3 min	2mal
Isopropanol	-	-	je 3 min	2mal
Alkohol (96 %ig)	je 2 min	2mal	je 3 min	2mal
Alkohol (70 %ig)	je 2 min	2mal	je 3 min	1mal
Alkohol (50 %ig)	-	-	je 3 min	1mal
<i>Aqua destillata</i>	5 min	1mal	5 min	1mal

**Erläuterung:** **HE** = Hämalaun-Eosin, **IH** = Immunhistologie

Für die Hämalaun-Eosin-Färbung wurden die Schnitte in eine filtrierte Hämalaun-Lösung nach P. Mayer verbracht und für 15 bis 25 min gefärbt. Das Bläuen erfolgte durch eine 10 minütige Spülung mit Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte 3mal mit *A. dest.* gespült, 3 min mit filtriertem 1%igem Eosin gegengefärbt und wiederum mit Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (zweimaliges

Eintauchen in 70 %igem, 80 %igem und 2mal bis zu 2 min in 96 %igem Alkohol) und in Karbolxylol und Xylol geklärt. Das luftdichte Eindecken erfolgte mittels Deckgläsern und Kanadabalsam.

### 5.5.4 Immunhistologische (IH-) Färbung von *E. coli*-Antigen im Paraffinschnitt

Die Paraffinschnitte wurden zum Ablauen des Paraffins vor Beginn der Reaktion 30 min bei 60 °C gelagert. Dann wurden die Schnitte in Reagenzien zunehmender Hydrophilie eingetaucht (Tab. 12). Durch eine 25 minütige Inkubation der Schnitte in 0,45 %igem Wasserstoffperoxid (in Methanol) erfolgte eine Hemmung der gewebeeigenen Peroxidase. Danach wurden die Schnitte dreimalig in Dulbecco's PBS-Puffer (DPBS)-Gebrauchslösung gespült. Zur Freilegung vernetzter Epitope folgte ein Verdau mit Trypsinlösung<sup>B</sup> (20 min, 37 °C). Die Reaktion wurde durch Spülen mit kaltem Leitungswasser gestoppt (10 min) und die Schnitte anschließend mit DPBS gespült. Nachfolgend wurden die Schnitte luftblasenfrei auf Shandon™ Glass Coverplates befestigt, in *slide racks* eingesetzt und 2mal erneut mit DPBS gespült. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden sie mit Normalserum von der Ziege (eigene Herstellung, Inaktivierung: 30 min, 56 °C, Verdünnung: 1:10 mit BSA/DPBS) inkubiert (20 min, RT). Daraufhin wurde der entsprechende polyklonale Primärantikörper (Tab. 4) aufgetragen und inkubiert (60 min, RT). Zur Kontrolle des korrekten Ablaufes der Reaktion wurde stets ein Schnitt aus der Muskulatur eines Kalbes, welche mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm versetzt wurde, als Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Konsekutiv der Positivkontrolle, welches mit BSA/DPBS statt des primären Antikörpers inkubiert wurde. Nach 3maliger Spülung mit DPBS wurde ein Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Verdünnung 1:50 mit BSA/DPBS) aufgetragen und inkubiert (60 min, RT). Der sekundäre Antikörper wurde 2mal mit DPBS abgespült und die Schnitte in Küvetten mit DPBS verbracht. Zur Enzym-Substrat-Reaktion wurden die Schnitte in DAB-Lösung inkubiert (10 min, RT) und anschließend zur Beendigung der Reaktion 2mal mit *A. dest.* gespült. Nach mikroskopischer Kontrolle erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung für 2 min. Durch 10minütiges Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte gebläut. Sie wurden mit Kaiser's Glyceringelatine und Deckgläschen luftdicht eingedeckt.

### 5.5.5 Lichtmikroskopische Beurteilung der histologischen Schnitte

Die histologische Bewertung der Präparate erfolgte lichtmikroskopisch. Von jeder Gewebeprobe wurde 1 HE-Übersichtsfärbung sowie 1 immunhistologisch gefärbter Schnitt aus-

gewertet. Von den an der RAJ und ICE gewonnenen Proben der mit den Stämmen 86-24 Nal und LB226692 inokulierten Tiere wurden je Lokalisation 2 HE-Übersichtsfärbungen sowie 3 – 10 immunhistologisch gefärbte Schnitte untersucht. Dabei stand die Feststellung histologischer Veränderungen und der Nachweis von kolonisierenden *E. coli* im Vordergrund. Hierfür wurden die Schnitte in der HE-Färbung auf Epithel-assoziierte Bakterien untersucht und, falls vorhanden, diese durch spezifische Markierung in der Immunhistologie bestätigt. Als positiv wurden Schnitte mit spezifisch markierten adhärennten Bakterien an einer oder mehreren Lokalisation(en) gewertet, wenn zusätzlich die entsprechenden Bakterien bei Färbung mit einem unspezifischen Antikörper (z. B. bei Nachweis von LB226692 das *E. coli* OK O157 Antiserum) nicht markiert wurden. Ein Schnitt wurde als fraglich bewertet, wenn die markierten Strukturen in Form, Größe oder Lage oder aufgrund des Schnittzustandes nicht eindeutig dem entsprechenden Inokulationsstamm zuzuordnen waren oder Interaktionen mit den Epithelzellen nicht zweifelsfrei geklärt werden konnten. Als negativ wurden alle Schnitte gewertet, wenn in der IH-Färbung keine spezifische Markierung erkennbar war, auch wenn in der HE-Färbung Epithel-assoziierte Bakterien detektiert wurden.

## **5.6 Zellkulturmethoden**

### **5.6.1 Kultivierung der Verozellen**

Die Verozellen wurden in Zellkultur-Flaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung mit Zellkulturmedium 1 kultiviert. Zum Ernten der Zellen für den Einsatz in Tests bzw. zur Ausdünnung der Zellen zur Weiterkultivierung wurden nach Entnahme des Mediums die Mediumreste durch Spülen der Flaschen mit 10 ml PBS-Puffer<sup>A</sup> entfernt. Anschließend wurden jeweils 4 ml Trypsinlösung<sup>A</sup> zu den Zellen gegeben und diese für 5 - 7 min im Brutschrank bis zur Ablösung des Monolayers inkubiert. Nachdem die Zellen durch Abklopfen vom Flaschenboden gelöst wurden, wurde 5 ml Zellkulturmedium 1 zugegeben und die Zellsuspension anschließend in ein 50 ml-Plastikgefäße überführt. Dann erfolgte eine 9 minütige Zentrifugation (9 min, 900 x g, RT). Nach dem Dekantieren des Überstandes konnten die Zellpellets in jeweils 3 ml Zellkulturmedium 1 resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzählung entnommen werden.

Für die Weiterkultivierung wurde die 0,1fache Menge der Zellsuspension in eine neue Zellkultur-Flasche mit vorgelegten 15 ml Zellkulturmedium 1 gegeben. Für den Einsatz im Test erfolgte die Bestimmung der Zellzahl nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer

Neubauer-Zählkammer. Die für den jeweiligen Test erforderliche Zellzahl wurde durch die Zugabe von Zellkulturmedium 1 eingestellt.

### 5.6.2 Verozell-Zytotoxizitätstest (Vero-ZT)

Um die Zytotoxizität der verwendeten Toxinpräparationen (Stx1, rStx2<sub>WT</sub>) sowie der Toxingebrauchslösungen (80 CD<sub>50</sub> Stx1/ml bzw. rStx2<sub>WT</sub>/ml) zu kontrollieren, wurde ein Vero-ZT, modifiziert nach GENTRY und DALRYMPLE [96] durchgeführt. Der Zytotoxizitätstest erfolgt im Mikrotiterformat, wobei 3 Komponenten à 50 µl nacheinander in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten (96-Loch) pipettiert wurden:

1. Komponente: In die Vertiefungen der Kontrollen und zum Anlegen der Verdünnungsreihe wurden jeweils 50 µl Zellkulturmedium 1 vorgelegt.
2. Komponente: Sie enthielt die auf Zytotoxizität zu überprüfende Probe, welche nach Bedarf in Zellkulturmedium 1 vorverdünnt war und dann in Zellkulturmedium 1 logarithmisch ausverdünnt wurde. Bei der Überprüfung der Zytotoxizität des verwendeten Toxins wurde dieses zunächst unverdünnt vorgelegt und anschließend in log<sub>10</sub>-Stufen über 8 Schritte in Zellkulturmedium 1 titriert. Im Falle der Überprüfung der Zytotoxizität der eingestellten Toxingebrauchslösung für die weiteren Versuche wurde die für den Test frisch angesetzte Toxingebrauchslösung (80 CD<sub>50</sub>/ml) in log<sub>2</sub>-Stufen in Zellkulturmedium 1 ausverdünnt. Jede untersuchte Probe wurde in allen vorliegenden Verdünnungsstufen im Dreifachansatz getestet. Die Kontrollen waren den Testansätzen benachbart auf der Mikrotiterplatte angeordnet. Die Positivkontrolle enthielt bei allen Versuchen 50 µl einer 1 % SDS-Lösung und die Negativkontrolle 50 µl Zellkulturmedium 1.
3. Komponente: Sie enthielt die Verozellsuspension in Zellkulturmedium 1, eingestellt auf eine Zellzahl von  $4 \times 10^4$  Zellen/50 µl/Vertiefung. In die äußeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 200 µl NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz pipettiert. Die Inkubation des Testes erfolgte für 96 Stunden (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung).

Nach 96 h Inkubation erfolgte die mikroskopische Auswertung zur Bestimmung des Anteils abgestorbener Verozellen und zum Ausschluss von Kontaminationen. Eine Quantifizierung der zytostatischen und -toxischen Effekte erfolgte anschließend durch einen kolorimetrischen Test unter Verwendung eines Farbstoffes, der nur von lebenden Zellen reduziert wird. Dieser Farbstoff, ein Tetrazoliumsalz, 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), wird von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien zu einem violettfarbenen Formazan umgesetzt. Der im MTT-Test bestimmte Parameter wird als „Stoffwechsel-

aktivität“ bezeichnet. Der Test wurde in der Modifikation von TADA *et al.* durchgeführt [288]. Am Ende der Inkubationsdauer wurden zu jedem Ansatz in der Mikrotiterplatte 20 µl der MTT-Stammlösung pipettiert und die Platte 4 h bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion durch Zerstörung der Zellen und zum Lösen des in wässriger Lösung unlöslichen Formazans erhielt jede Vertiefung 100 µl einer 10%igen SDS-Lösung. Anschließend wurde die Inkubation über Nacht fortgeführt. Die Messung der Extinktionsdifferenzen (540 nm als Testwellenlänge, 690 nm als Referenzwellenlänge) in den einzelnen Vertiefungen mit einem Plattenphotometer erfolgte parallel zu einer makroskopischen Beurteilung des Farbumschlages zur Absicherung des Testergebnisses. Alle im Weiteren getätigten Berechnungen wurden mit Microsoft® Excel 2010 durchgeführt.

Die Ermittlung der absoluten optischen Dichte (OD[abs]) der Proben und Kontrollen erfolgte durch die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Ansätze:

$$\text{OD[abs]} = (\text{OD}_{\text{Ansatz 1}} + \text{OD}_{\text{Ansatz 2}} + \text{OD}_{\text{Ansatz 3}}) / 3$$

Die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen wurde in Bezug zur Positiv- (OD[abs]<sub>PoKo</sub>) und Negativkontrolle (OD[abs]<sub>NeKo</sub>) in der jeweiligen Mikrotiterplatte standardisiert. Dabei diente die folgende Formel der Ermittlung der relativen optischen Dichte OD[rel] [in %]:

$$\text{OD[rel] [in \%]} = (\text{OD[abs]}_{\text{Probe}} - \text{OD[abs]}_{\text{PoKo}}) / (\text{OD[abs]}_{\text{NeKo}} - \text{OD[abs]}_{\text{PoKo}}) \times 100$$

### **Berechnung der verozytotoxischen Dosis 50 %**

Zur Auswertung des Vero-ZT wurde die „verozytotoxische Dosis 50 %“ pro Milliliter (CD<sub>50</sub>/ml) rechnerisch ermittelt. Dazu wurde zunächst die Stoffwechselaktivität von Verozellen (relative Zellaktivität, OD[rel]) nach Titration mit Stx1 und rStx2<sub>WT</sub> gegen die log-Verdünnungsstufen der zu bestimmenden Probe gezeichnet (Abb. 3, A).

Die ermittelten OD[abs]-Werte wurden einer logit-log-Transformation unterzogen, um eine Linearisierung des mittleren Abschnittes der Zellaktivitätskurve zu erreichen (Abb. 3, B). Dies erfolgte mit Hilfe der Formel:

$$\text{logit-log-OD[abs]} = \log_{10} [(\text{OD[abs]} - \text{UG}) / (\text{OG} - \text{OD[abs]})]$$

Als Untergrenze (UG) wurde die OD[abs] der Positivkontrolle (OD[abs]<sub>PoKo</sub>) eingesetzt, sofern alle OD[rel] -Werte der Proben  $\geq 0$  % lagen. War dies nicht der Fall, wurde der kleinste OD[abs]-Wert minus 0,001 als Untergrenze (UG) festgesetzt. Als Obergrenze (OG)

wurde die OD[abs] der Negativkontrolle (OD[abs]<sub>NeKo</sub>) eingesetzt, falls alle OD[abs]-Werte der Proben einen Wert  $\leq 100\%$  aufwiesen. Traf dies nicht zu, wurde der größte OD[abs]-Wert plus 0,001 als Obergrenze definiert.

Im nächsten Schritt wurde anhand der ermittelten logit-log-OD[abs]-Werte der Kurvenabschnitt ermittelt, bei dem eine relative Zellaktivität 50 % vorlag. Dies entspricht dem Schnittpunkt der nach logit-log-Transformation linearisierten Kurve mit der x-Achse. Dann wurden zwei Messwerte oberhalb und zwei Messwerte unterhalb dieses Schnittpunktes zur Berechnung der Toxinkonzentration  $CD_{50}/ml$  herangezogen. Es wurden nur dann weniger Messwerte in die Berechnung einbezogen, wenn Werte innerhalb der linearisierten Kurve nicht kontinuierlich anstiegen (Editierung der logit-log-transformierten Werte).

Anschließend wurde die Steigung „m“ und der y-Achsenabschnitt „b“ des entsprechenden Kurvenabschnittes mit den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Steigung } m = \text{INDEX (RGP(A:B:C:D);1)}$$

$$\text{Y-Achsenabschnitt } b = \text{INDEX (RGP(A:B:C:D);2)}$$

wobei gilt:

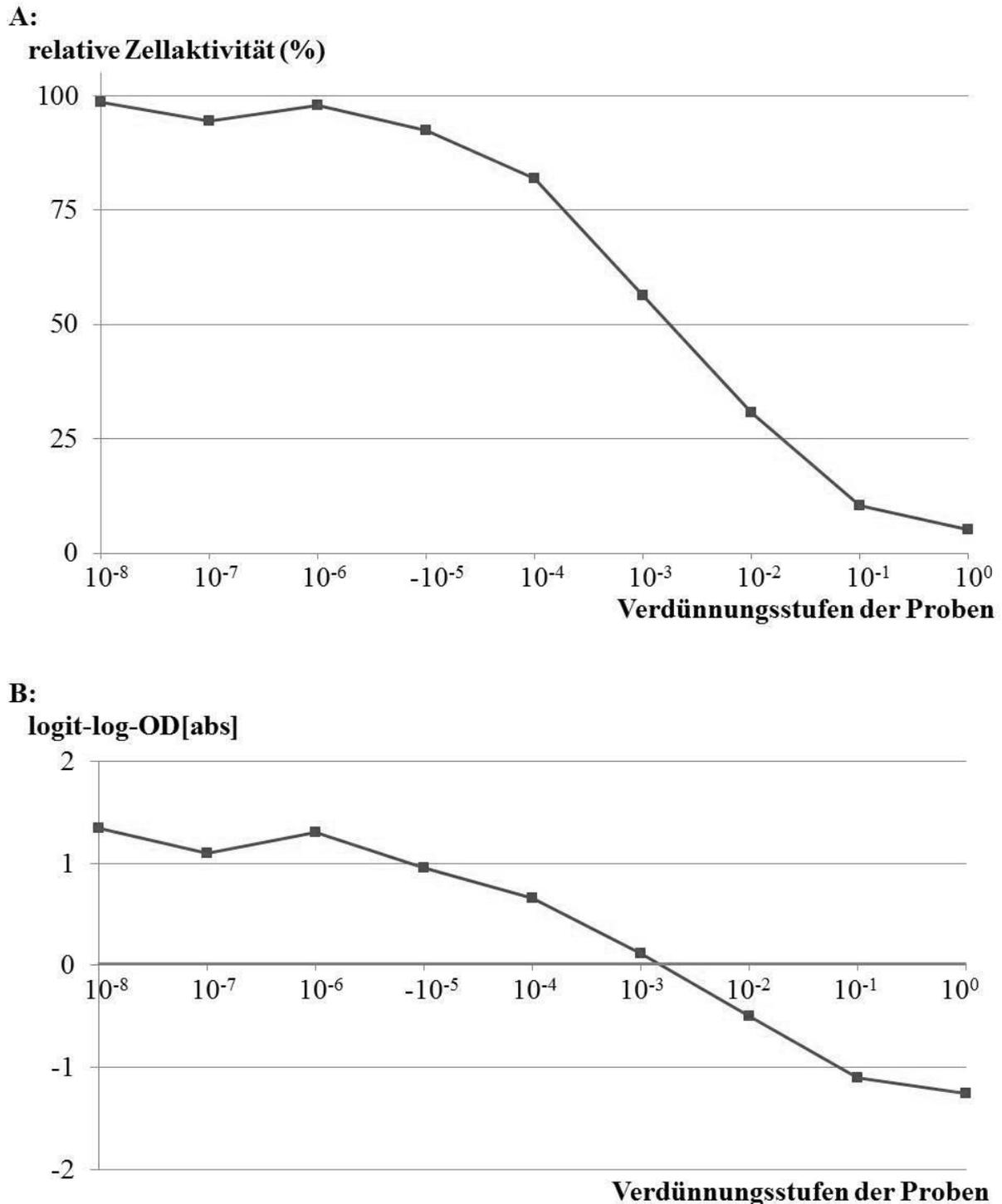
- A = kleinste gültige logit-log-OD[abs]
- B = größte gültige logit-log-OD[abs]
- C = Verdünnungsstufe der kleinsten gültigen logit-log-OD[abs]
- D = Verdünnungsstufe der größten gültigen logit-log-OD[abs]

Als Verdünnungsstufen wurden bei diesem Rechenschritt die Exponenten der jeweiligen log-Verdünnungsstufe eingesetzt (z.B. -2 bei der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ ).

Mit „m“ und „b“ wurde dann die Toxinkonzentration in  $CD_{50}/\text{Vertiefung}$  mit der Formel

$$CD_{50}/\text{Vertiefung} = x^{(b/m)}$$

berechnet. x stellt in diesem Fall den Modus der logarithmischen Verdünnung, z.B. 10 bei einer  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe, dar. Dieser Schritt ermöglichte es, die log-Verdünnungsstufe zu extrapolieren, bei der die transformierte Kurve die x-Achse schneidet, d.h. die Zellaktivität auf genau 50 % reduziert worden wäre.



**Abb. 3:** **A: Kurvenverlauf der relativen Zellaktivität nach einer log<sub>10</sub>-Titration von Stx** (schematische Darstellung). Aufgetragen ist die relative Zellaktivität [%] gegen die entsprechenden log-Verdünnungsstufen des titrierten Stx.  
**B: Kurvenverlauf der OD[abs]-Werte nach logit-log-Transformation** (schematische Darstellung). In die Berechnung zur Ermittlung des Schnittpunktes der Geraden mit der x-Achse (entspricht der Toxinverdünnung, bei der eine 50 %ige Zellaktivität vorliegt) gehen zwei logit-log-OD[abs]-Werte ober- und unterhalb des Schnittpunktes mit der x-Achse ein.

Nachfolgend wurde durch Multiplikation des errechneten Wertes mit 20 die Toxin-konzentration in  $CD_{50}/ml$  ermittelt:

$$CD_{50}/ml = CD_{50}/\text{Vertiefung} \times 20$$

Zum Schluss erfolgte eine Plausibilitätsprüfung ob der errechnete  $CD_{50}$ -Wert mit den mikroskopisch, farblich und grafisch ermittelten Werten übereinstimmt.

### **Berechnung der Stammlösung der Toxinpräparationen**

Diese Berechnung wurde für die Toxinpräparationen (Stx1, rStx2<sub>WT</sub>) auf jeder neu aufgetauten Charge von Verozellen durchgeführt. Der dabei ermittelte  $CD_{50}$ -Wert diente der Berechnung der benötigten Menge dieser Ausgangslösung für die Toxingebrauchslösungen (80  $CD_{50}$  Stx1/ml bzw. rStx2<sub>WT</sub>/ml) im Vero-NT. Ebenfalls nach dieser Methode wurde der  $CD_{50}$ -Wert dieser im NT eingesetzten Stx1/Stx2-Gebrauchslösungen ermittelt und so deren korrekte Einstellung auf 4  $CD_{50}/\text{Vertiefung}$  bzw. 80  $CD_{50}/ml$  überprüft (Rücktitration). Die mit Zellkulturmedium 1 eingestellte Lösung wurde dann im Vero-NT zum Nachweis Stx-spezifischer Antikörper in den Serumproben eingesetzt. Für Stx1 ergaben die Rücktitrationen im Mittel 81  $CD_{50}/ml$  (n = 8), für rStx2<sub>WT</sub> 83  $CD_{50}/ml$  (n = 10).

### **5.6.3 Verozell-Neutralisationstest (Vero-NT)**

Zur Überprüfung des Vorhandenseins von Stx-spezifischen Antikörpern in Serumproben wurde der Vero-NT eingesetzt. Dabei wurde das Testsystem nach GENTRY und DALRYMPLE [96] zum Nachweis der Zytotoxizität von Stx modifiziert. Der Test wurde in Mikrotiterplatten (96-Loch) durchgeführt und ausgewertet. Die Serumproben wurden vor dem Einsatz im Vero-NT bei 56 °C für 30 min im Schüttelwasserbad hitzeinaktiviert und anschließend zentrifugiert (10 min, RT, 13.400 x g).

Der Zellkulturtest setzte sich aus drei Komponenten à 50 µl Flüssigkeitsvolumen zusammen, welche nacheinander in die Mikrotiterplatten pipettiert wurden.

1. Komponente: Sie enthielt das auf Stx1/Stx2-spezifische neutralisierende Antikörper zu testende Serum, welches 1:10 in Zellkulturmedium 1 vorverdünnt wurde, so dass stets eine Verdünnung der Proben von 1:30 je Vertiefung vorlag. Jede Probe wurde doppelt aufgetragen und im Dreifachansatz getestet. Im Falle der Positiv- und Negativkontrolle wurden in dieser Komponente ausschließlich 50 µl Zellkulturmedium 2 eingesetzt. Zur Kontrolle wurden außerdem 2 Seren (eigene Herstellung) mit einem definierten Antikörpertiter (Tab. 4)

ebenfalls 1:10 in Zellkulturmedium 1 vorverdünnt und im Test mitgeführt. Die Kontrollen waren den Testansätzen benachbart auf der Mikrotiterplatte angeordnet.

2. Komponente: In dieser Komponente wurden die Toxingebrauchslösungen (80 CD<sub>50</sub>Stx1/ml bzw. rStx2<sub>WT</sub>/ml in Zellkulturmedium 1) zugegeben. Das toxische Medium wurde zu einem der beiden Dreifachansätze der Proben und der Kontrollseren (s.o.), sowie zur Positivkontrolle gegeben. Der andere Dreifachansatz wurde zur Testung auf zytotoxische Effekte der Serumproben, ebenso wie die Negativkontrolle, dagegen ausschließlich mit Zellkulturmedium 1 versetzt.

3. Komponente: Sie enthielt eine Verozellsuspension in Zellkulturmedium 1, eingestellt auf eine Zellzahl von  $4 \times 10^4$  Zellen/50 µl/Vertiefung. In die äußeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 200 µl NaCl-Lösung als Verdunstungsschutz pipettiert. Die Inkubation des Testes erfolgte für 96 Stunden (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, Wasserdampfsättigung).

### **Bestimmung des Neutralisationstiter**

Im MTT-Test wurde die absolute optische Dichte (OD[abs]) der Proben und Kontrollen wie für den Vero-ZT beschrieben ermittelt. Die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen wurde in Bezug zur Positivkontrolle (OD[abs]<sub>PoKo</sub>) und zum jeweiligen toxischen Dreifachansatz (OD[abs]<sub>toxfrei</sub>) der Serumprobe standardisiert. Dabei diente die folgende Formel der Ermittlung der relativen optischen Dichte OD[rel] [in %]:

$$\text{OD[rel] [in \%]} = (\text{OD[abs]}_{\text{Probe}} - \text{OD[abs]}_{\text{PoKo}}) / (\text{OD[abs]}_{\text{toxfrei}} - \text{OD[abs]}_{\text{PoKo}}) \times 100$$

Proben mit einer relativen Zellaktivität von über 50 % wurden als positiv bewertet, da ein neutralisierender Antikörpertiter vorlag. Proben, die keine relative Zellaktivität von mindestens 50 % erreichten, wurden als negativ angesehen.

### **5.7 Statistische Auswertung**

Die Erfassung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme von Microsoft® Excel Version 2010 für Windows. Die statistische Auswertung wurde mit IBM® SPSS® Statistics Version 22 für Windows durchgeführt. Die Daten wurden zunächst in einer deskriptiven Statistik auf Homogenität der Varianzen in Vergleichsgruppen (Levene-Test) und auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, Q-Q-Diagramm) untersucht. Die Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test (exakte Signifikanz) durchgeführt. Korrelationen wurden mithilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet und anhand von Streudiagrammen dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Ergebnisse der Vortestung der Versuchstiere

Für die Einteilung in Inokulationsgruppen wurden im TV1 4 Kotproben je Kalb (entnommen 14 d, 13 d, 12 d vor und am Tag der Einstallung) auf Nalidixinsäure-resistente und ESBL-tragende *E. coli* untersucht. Im TV2 erfolgte die Untersuchung von 3 Kotproben je Kalb (entnommen 35 d - 23 d vor, am Tag der und einen Tag nach Einstallung; Tab. 13).

Zur Untersuchung auf bakterielle Durchfallerreger und Endoparasiten wurden Kotproben der Kälber vom Tag der Einstallung im Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz untersucht. Bei keinem der Versuchstiere konnten *Salmonella* spp. und *Yersinia* spp. nachgewiesen werden. Von den 30 Kälbern wurden jedoch 23 positiv auf *Eimeria* spp., sowie 11 positiv auf *Trichuris* spp. getestet (Tab. 22, Anhang).

Zusätzlich wurde die coliforme Keimflora der Kotproben (Gassner-Abschwemmung) von Tag 0, d.h. vor Inokulation, auf das Vorhandensein von *stx1*- und *stx2*-Genen, sowie des *aggR*-Gens untersucht. In 4 Kotproben konnten nur *stx1*-Gene nachgewiesen werden, in 9 Kotproben nur *stx2*-Gene. In 6 Kotproben waren sowohl *stx1*- als auch *stx2*-Gene nachweisbar. Bei keiner der Kotproben konnte das *aggR*-Gen nachgewiesen werden (Tab. 22, Anhang).

**Tab. 13:** Ergebnisse der Vortestung der Kotproben auf Selektivnährmedien und die Zuteilung der Kälber zu den Inokulationsgruppen

Tier nr.	Ver-such	Be-trieb	Wachstum auf										<i>E. coli</i> -Inokula-tions-stamm
			MacConkey-Agar-Nal (50 µg/ml)					BRILLIANCE ESBL Agar					
			Beprobungszeitpunkt*					Beprobungszeitpunkt*					
A1	A2	A3	B	C	A1	A2	A3	B	C				
1	TV1A	A	(-)	(+)	(+)	-	x	-	-	-	-	x	123
2	TV1A	A	-	(-)	(+)	-	x	-	-	-	-	x	123
3	TV1A	A	(-)	(-)	(-)	(-)	x	-	-	-	-	x	123
4	TV1A	A	(-)	(-)	(+)	-	x	-	(-)	-	-	x	86-24 Nal
5	TV1A	A	-	(+)	(+)	-	x	-	(-)	-	-	x	86-24 Nal
6	TV1A	A	(+)	-	(-)	-	x	(-)	-	-	-	x	86-24 Nal
7	TV1A	A	(-)	+	(+)	-	x	-	-	-	-	x	LB226692
8	TV1A	A	(+)	(-)	(+)	-	x	-	-	-	-	x	LB226692
9	TV1A	A	-	(-)	(+)	-	x	-	-	-	-	x	LB226692
10	TV1B	A	(+)	(+)	(+)	-	x	(-)	(+)	(-)	-	x	123
11	TV1B	A	(+)	(+)	(+)	-	x	(+)	(-)	(+)	-	x	123
12	TV1B	A	+	(+)	(-)	-	x	(+)	(+)	-	-	x	86-24 Nal
13	TV1B	A	(+)	(+)	(+)	-	x	(-)	(-)	(-)	-	x	86-24 Nal
14	TV1B	A	++	++	++	-	x	(+)	(+)	(-)	-	x	LB226692
15	TV1B	A	+	(+)	(+)	-	x	(+)	(-)	(-)	-	x	LB226692
16	TV2	B	(-)	x	x	-	-	++	x	x	-	-	123
17	TV2	C	(-)	x	x	-	-	(-)	x	x	-	-	123
18	TV2	C	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	123
19	TV2	A	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	123
20	TV2	A	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	123
21	TV2	B	(-)	x	x	-	-	++	x	x	-	-	86-24 Nal
22	TV2	B	(-)	x	x	-	-	(+)	x	x	-	-	86-24 Nal
23	TV2	C	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	86-24 Nal
24	TV2	C	(-)	x	x	-	-	-	x	x	-	-	86-24 Nal
25	TV2	A	-	x	x	(-)	-	-	x	x	-	-	86-24 Nal
26	TV2	B	-	x	x	-	-	-	x	x	-	-	LB226692
27	TV2	B	(-)	x	x	-	-	(-)	x	x	-	-	LB226692
28	TV2	C	(-)	x	x	-	-	-	x	x	-	-	LB226692
29	TV2	A	++	x	x	(-)	(-)	-	x	x	-	-	LB226692
30	TV2	A	(+)	x	x	-	-	-	x	x	-	-	LB226692

**Erläuterung** siehe nachfolgende Seite

**Tab. 14:** (Fortsetzung)

**Erläuterung:** -: kein Wachstum coliformer Keime, (-): wenige coliforme Einzelkolonien (< 10), (+): Wachstum coliformer Keime in 1. Verdünnungsstufe, + = Wachstum coliformer Keime bis 2. Verdünnungsstufe, ++: Wachstum coliformer Keime bis 3. Verdünnungsstufe, **x**: nicht durchgeführt, \* entnommen A) vor der Einstallung (TV1: 14, 13 und 12 d vorher; TV2: zwischen 35 und 23 d vorher), B) am Tag der Einstallung oder C) und einen Tag nach Einstallung, **TV** = Teilversuch

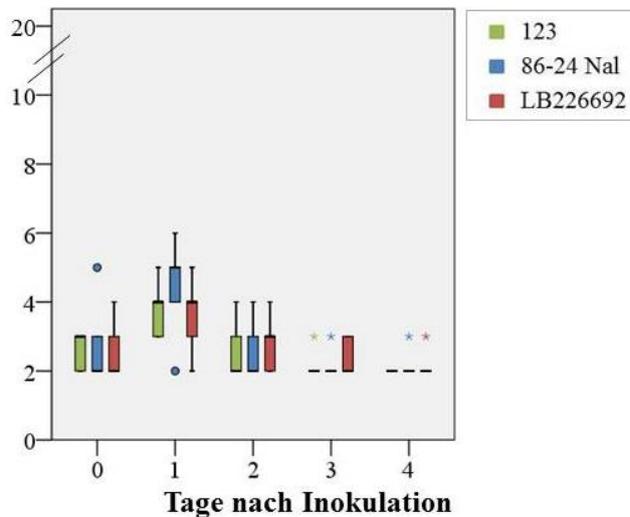
## 6.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Alle Kälber blieben während der gesamten Versuchsdauer klinisch unauffällig. Der klinische *score* der Kälber variierte während der Versuche zwischen 0 und 6 Bewertungspunkten (Abb. 4). Einige Kälber (n = 13) entwickelten einen Tag nach der Inokulation oder sporadisch im Versuchsverlauf (n = 11) Durchfall. Dieser dauerte jedoch nie länger als über 2 Beprobungszeitpunkte an. Bei allen Kälbern konnte des Weiteren zu mindestens einem Untersuchungszeitpunkt Husten und/ oder Nasenausfluss festgestellt werden.

Die rektale Körpertemperatur der Tiere befand sich größtenteils im physiologischen Bereich (38,0 – 39,5 °C; Abb. 5). Bei einzelnen Tieren (n = 8) wurden auch Temperaturen unter oder über (n = 6 Tiere) dem physiologischen Bereich zu einem Zeitpunkt bestimmt, jedoch nie um mehr als 0,5 °C abweichend und nie öfter als zu einem Messzeitpunkt pro Tier.

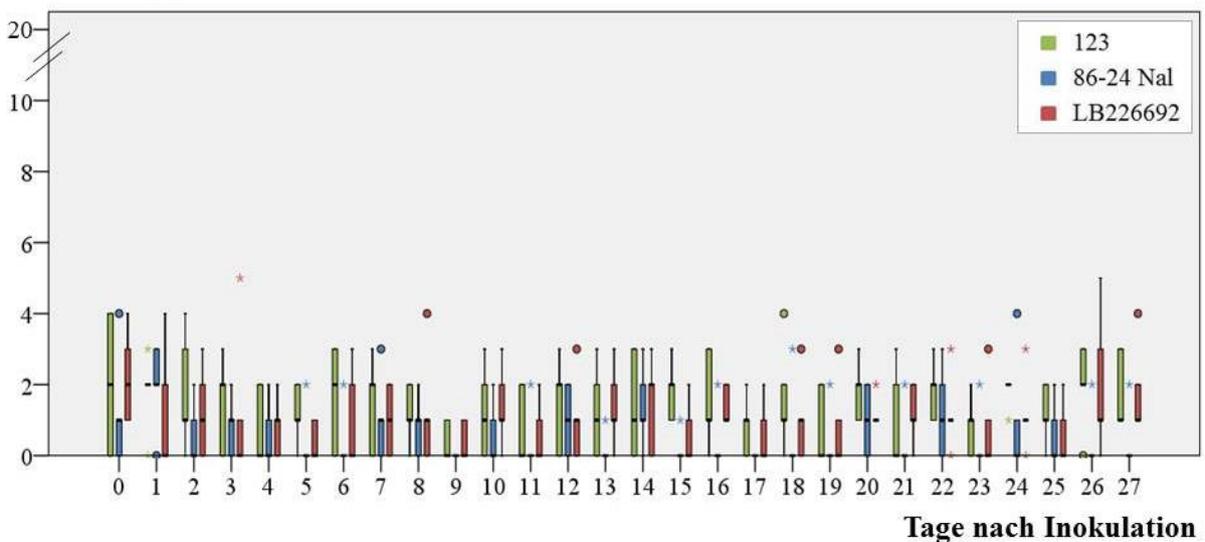
A:

klinischer score

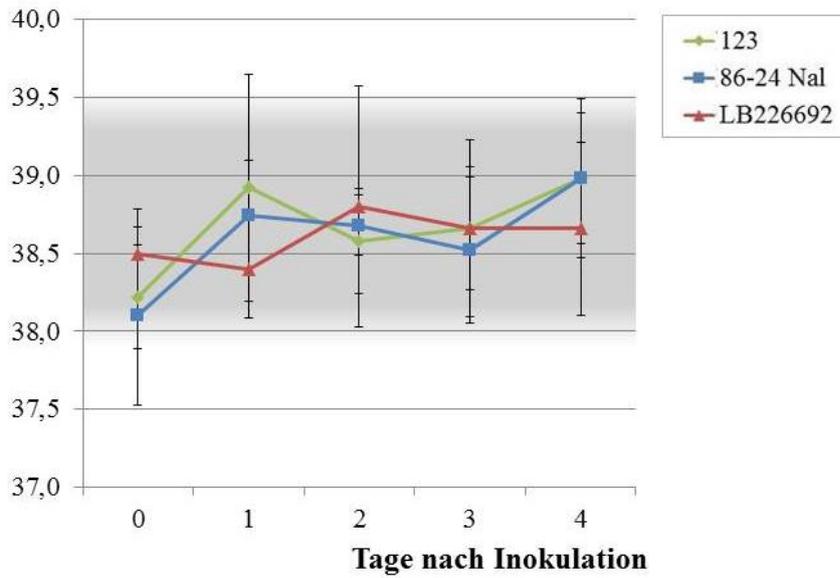
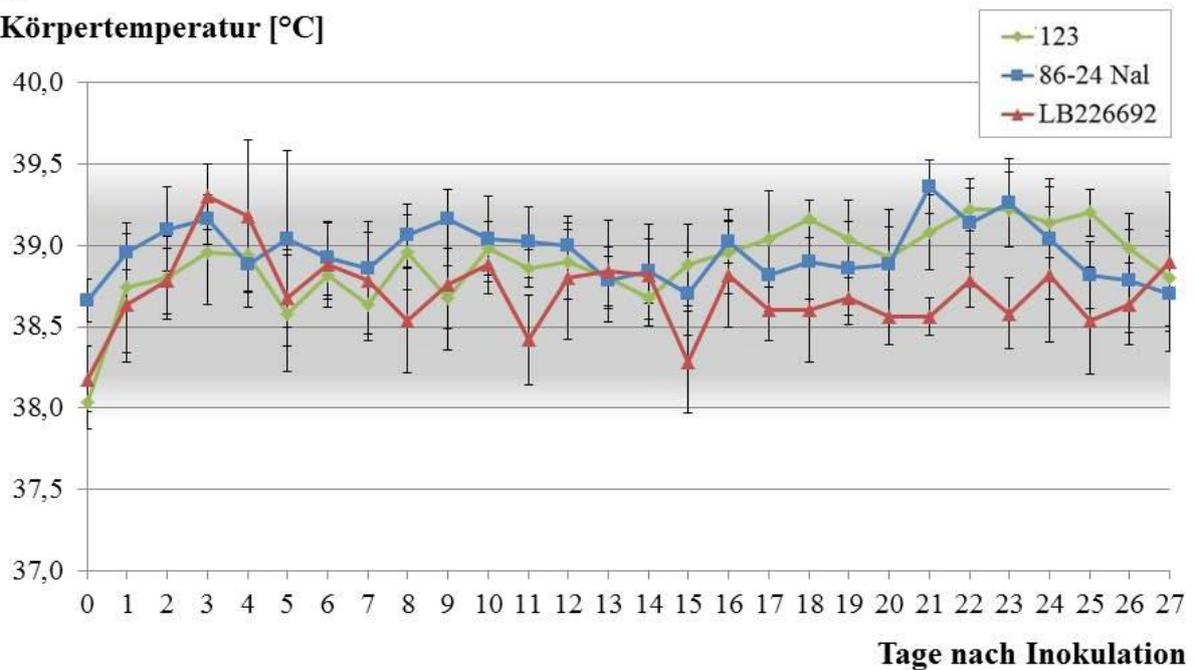


B:

klinischer score



**Abb. 4:** **Klinischer Score der Kälber im Versuchsverlauf (A: TV1, n = 5 Kälber/Gruppe; B: TV2, n = 5 Kälber/Gruppe).** Die Tiergruppen sind gemäß der jeweiligen zur Inokulation verwendeten *E. coli*-Stämme farblich unterschiedlich dargestellt (siehe Legende für Stammbezeichnungen). Die farbliche Zuordnung wird in allen weiteren Abbildungen einheitlich verwendet. Darstellung als Boxplots mit 25. und 75. Perzentil (farbige Box), Median (Linie), MIN/MAX, Ausreißer (◊) und Extremwerten (\*). Score: **0:** klinisch unauffällig bis **20:** moribund

**A:****Körpertemperatur [°C]****B:****Körpertemperatur [°C]**

**Abb. 5:** Körpertemperaturen der Kälber im Versuchsverlauf (**A:** TV1, n = 5 Kälber/Gruppe; **B:** TV2, n = 5 Kälber/Gruppe). Bezeichnung der Tiergruppen siehe Legende zu Abb. 4. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung. **grau hinterlegt:** physiologischer Bereich der Körpertemperatur eines Kalbes [89]

## 6.3 Ausscheidung der Inokulationsstämme

### 6.3.1 Ausscheidung über den Kot

Mittels KbE-Bestimmung wurde die Gesamtkeimzahl coliformer Bakterien auf den jeweiligen Selektivnährmedien in den Proben bestimmt. Als Re-Isolate des entsprechenden Inokulationsstammes wurden solche Isolate angesehen, die in Koloniemorphologie und Ergebnissen der OSA, der Koloniehybridisierung und der Multiplex-PCR dem Inokulationsstamm entsprachen. Der Anteil von Re-Isolaten des entsprechenden Inokulationsstammes an der Gesamtkeimzahl coliformer Bakterien schwankte dabei je nach Probe zwischen 0 und 100 %.

In keiner der Kotproben war vor der Inokulation der entsprechende Inokulationsstamm nachweisbar. Bei einem Tier (Kalb 5) konnte bereits 6 Stunden nach der Inokulation der Stamm 86-24 Nal (O157:H7, Stx+, Intimin+) in geringen Keimzahlen nachgewiesen werden. Die Kälber schieden die Inokulationsstämme in unterschiedlicher Zahl und Dauer aus (Tab. 23 und 24, Anhang). Aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus TV1A und TV1B (Abb. 6A und 6B) werden diese im Weiteren zusammengefasst als TV1 dargestellt. Über die ersten 4 dpi zeigte sich sowohl im TV1 (Abb. 7A) als auch im TV2 (Abb. 7B) ein ähnlicher Verlauf.

Im TV1 wurde der Stamm 123 (O43:H28, Stx-) am ersten und zweiten Tag nach der Inokulation mit  $3,0 \times 10^2$  bis  $3,7 \times 10^6$  KbE/g Kot ausgeschieden. Bis 4 dpi zeigte sich ein stetiger Abfall in der Anzahl der KbE/g Kot. Zu diesem Zeitpunkt war bei 3 Kälbern der negative Kontrollstamm auch in der Anreicherung nicht mehr nachweisbar, die anderen 2 Kälber zeigten eine Ausscheidung im Bereich zwischen  $1 \times 10^1$  und  $1,8 \times 10^3$  KbE/g Kot. Der Stamm 86-24 Nal wurde die ersten beiden Tage nach der Inokulation mit  $1,5 \times 10^3$  bis  $8,1 \times 10^6$  KbE/g Kot ausgeschieden. Die Ausscheidung des positiven Kontrollstammes variierte 4 dpi zwischen  $8,0 \times 10^2$  und  $1,1 \times 10^6$  KbE/g Kot. Der Stamm LB226692 (O104:H4, Stx+, AAF/I+) wurde am ersten und zweiten Tag nach Inokulation mit  $5,5 \times 10^3$  bis  $2,4 \times 10^7$  KbE/g Kot ausgeschieden. Ein Tier (Kalb 15) zeigte nach zunächst abfallenden Werten einen sprunghaften Anstieg der Keimzahlen bis auf  $1,3 \times 10^8$  KbE/g Kot in der Vormittagsprobe an Tag 3. Die Ausscheidung variierte 4 dpi zwischen fehlendem Nachweis bei einem Kalb bis zu einer Ausscheidung von  $1,2 \times 10^4$  bis  $6,6 \times 10^5$  KbE/g Kot bei den übrigen 4 Kälbern. Im TV1 waren die Unterschiede in der fäkalen Ausscheidung zwischen dem Stamm 86-24 Nal und Stamm 123 zu den Beprobungszeitpunkten 3 und 4 dpi statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test (exakte Signifikanz),  $p < 0,05$ ).

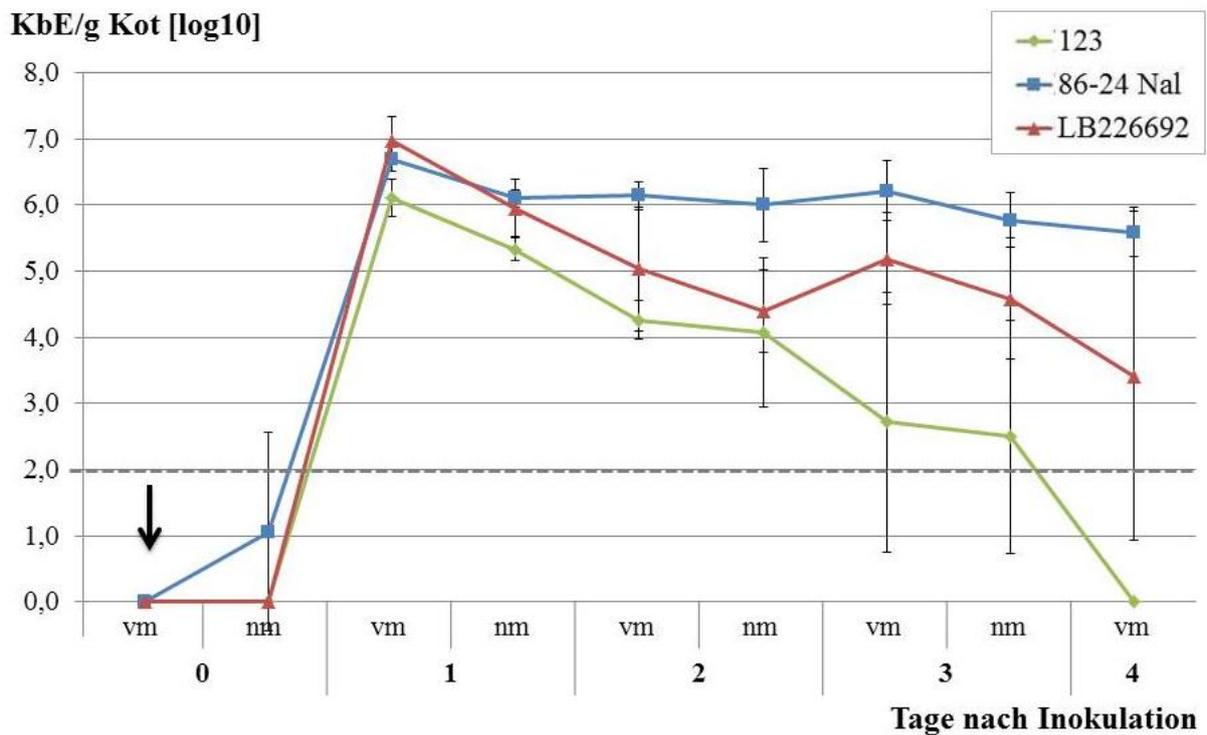
Im TV2 wurde der Stamm 123 am ersten und zweiten Tag nach der Inokulation in vergleichbaren Zahlen ( $3,0 \times 10^2$  bis  $1,8 \times 10^5$  KbE/g Kot) wie im TV1 ausgeschieden. Bei einem Tier (Kalb 20) war der erste Nachweis des Stammes erst 2 dpi möglich. Zum Beprobungszeitpunkt 4 dpi war analog zum TV1 bei 3 Kälbern der negative Kontrollstamm auch in der Anreicherung nicht mehr nachweisbar, die anderen 2 Kälber zeigten eine Ausscheidung im Bereich zwischen  $1 \times 10^1$  und  $7,0 \times 10^2$  KbE/g Kot. Im weiteren Verlauf war der Stamm 123 ab 8 dpi nur noch bei einem Kalb über die Verdünnungsreihe quantifizierbar und ab 12 dpi auch bei diesem nicht mehr über Anreicherung nachweisbar.

Der Stamm 86-24 Nal wurde im TV2 an den ersten beiden Tagen nach Inokulation in vergleichbaren Zahlen ( $2,6 \times 10^4$  bis  $5,6 \times 10^6$  KbE/g Kot) wie im TV1 ausgeschieden. Die Ausscheidung variierte 4 dpi analog zum TV1 zwischen  $2,4 \times 10^3$  und  $4,6 \times 10^5$  KbE/g Kot. Anschließend zeigte der positive Kontrollstamm einen alternierenden Verlauf, dabei fiel die Ausscheidung teilweise bis unter die Nachweisgrenze. Bei allen 5 Kälbern konnte jedoch, auch wenn zu einem Zeitpunkt keine Ausscheidung mehr detektierbar war, zu mindestens einem nachfolgenden Beprobungszeitpunkt erneut eine Ausscheidung des positiven Kontrollstammes nachgewiesen werden. Am Ende des TV2, 28 dpi, konnte der Stamm 86-24 Nal bei 4 Kälbern im Bereich von  $1 \times 10^1$  bis  $3 \times 10^3$  KbE/g Kot und bei einem Kalb nicht mehr nachgewiesen werden.

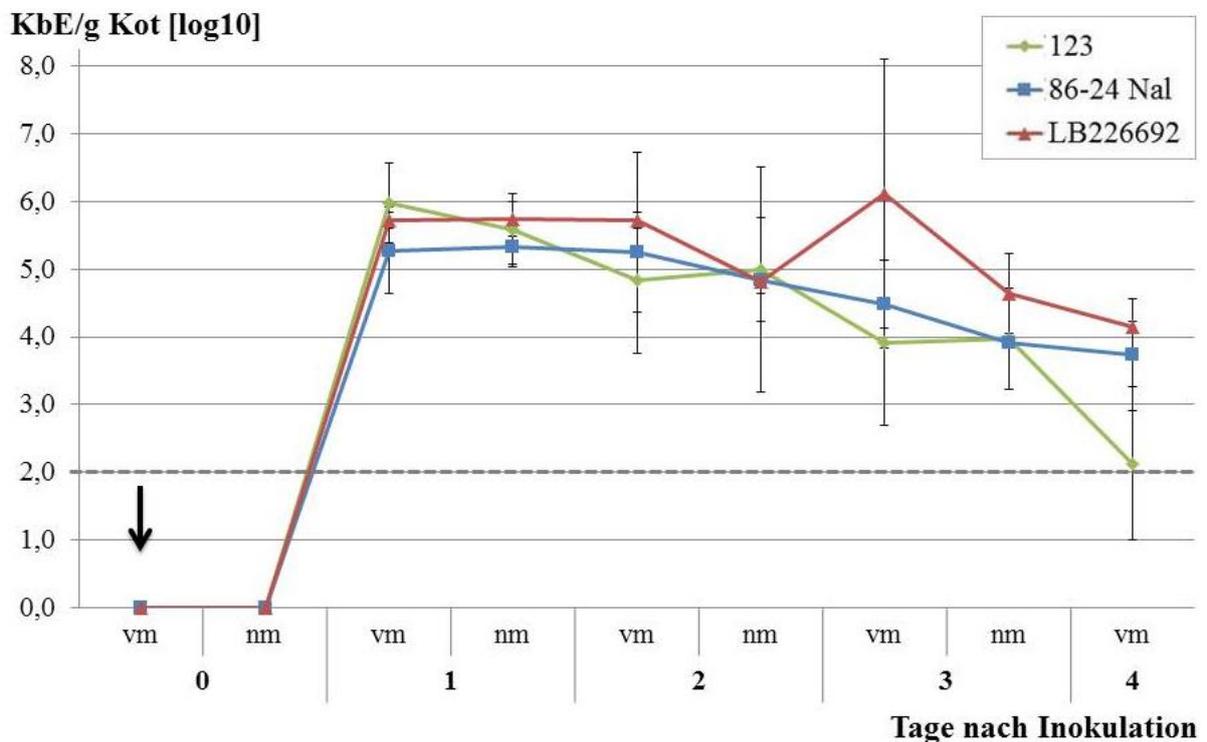
Im TV2 wurde der Stamm LB226692 am ersten und zweiten Tag nach der Inokulation in vergleichbaren Zahlen ( $4,7 \times 10^3$  bis  $6,2 \times 10^5$  KbE/g Kot) wie im TV1 ausgeschieden. Die Ausscheidung variierte 4 dpi von  $10$  bis  $4,2 \times 10^4$  KbE/g Kot. Anschließend zeigte der Stamm LB226692 eine abfallende Tendenz in der Ausscheidungsrate. Der Stamm war 18 dpi nur noch bei 2 Kälbern per Anreicherung nachweisbar. Anschließend war er jedoch 20, 22 und 24 dpi bei einem einzelnen Tier (Kalb 29) erneut per Verdünnungsreihe nachweisbar. Ab 26 dpi konnte kein Nachweis mehr erbracht werden.

Im TV2 zeigte sich 1 bis 12 dpi, sowie 16 bis 22 dpi und 28 dpi eine signifikant höhere Ausscheidung des Stammes 86-24 Nal im Vergleich zum Stamm 123. Zwischen dem Stamm LB226692 und dem Stamm 123 zeigte sich nur 2 dpi ein signifikanter Unterschied in der Ausscheidung. Des Weiteren unterschied sich die Ausscheidung zwischen dem Stamm LB226692 und dem Stamm 86-24 Nal 6, 8, 18 und 28 dpi signifikant (Mann-Whitney U-Test (exakte Signifikanz),  $p < 0,05$ ).

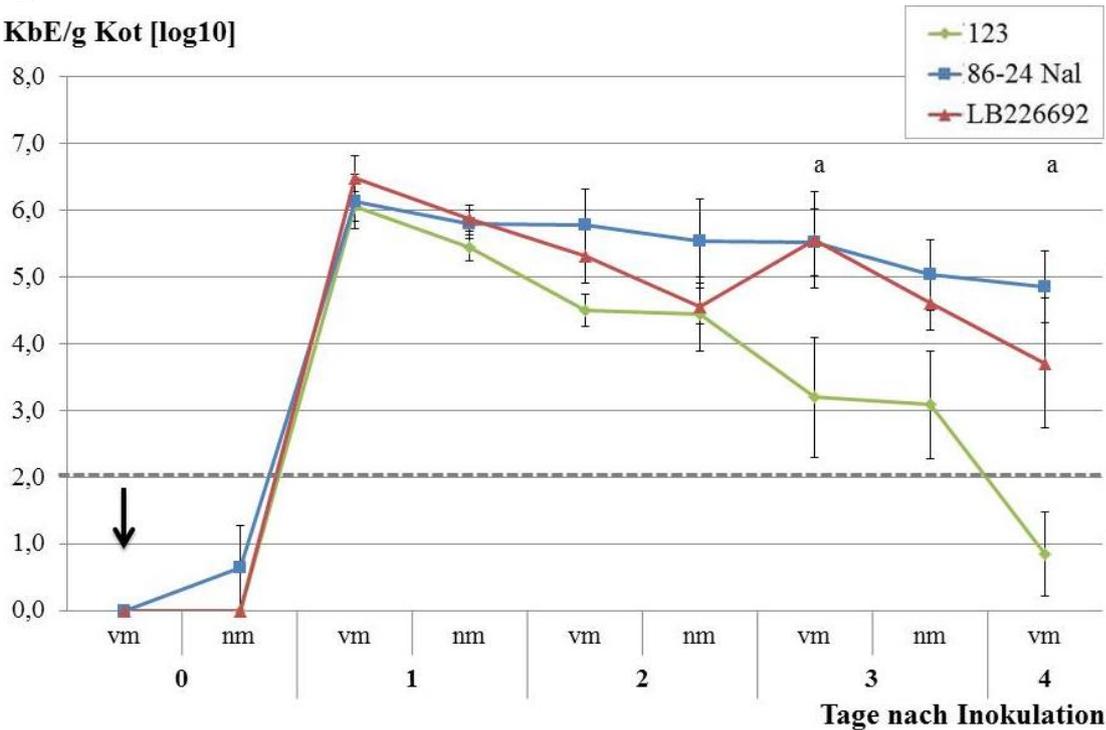
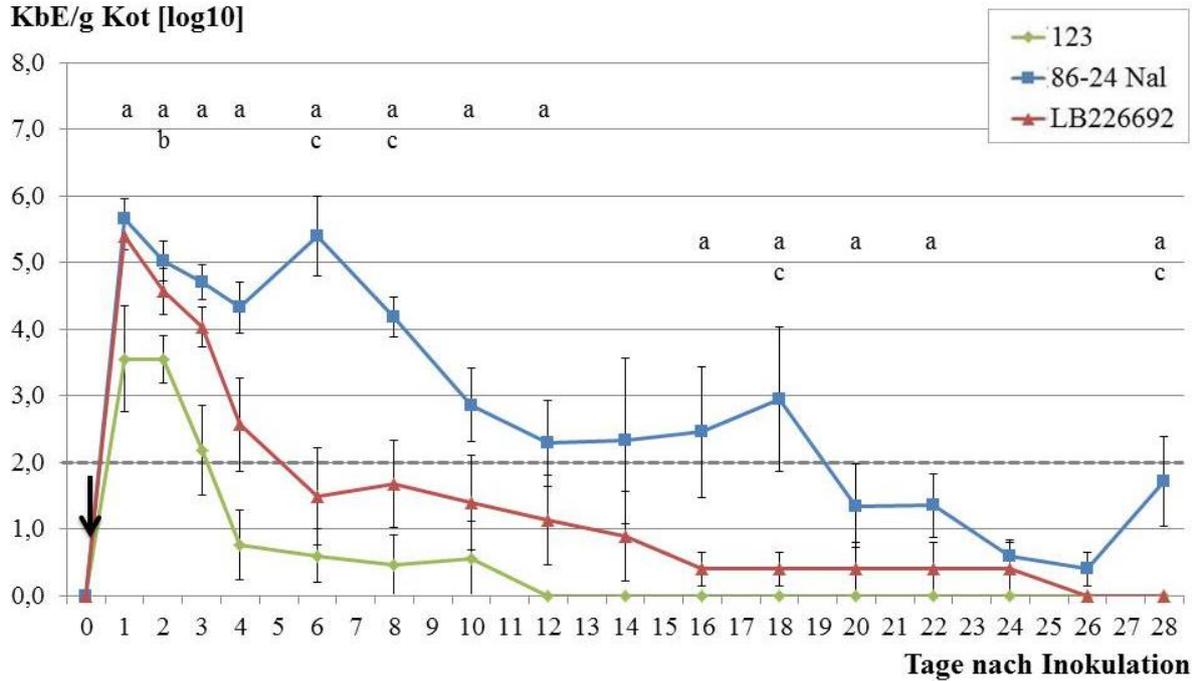
A:



B:

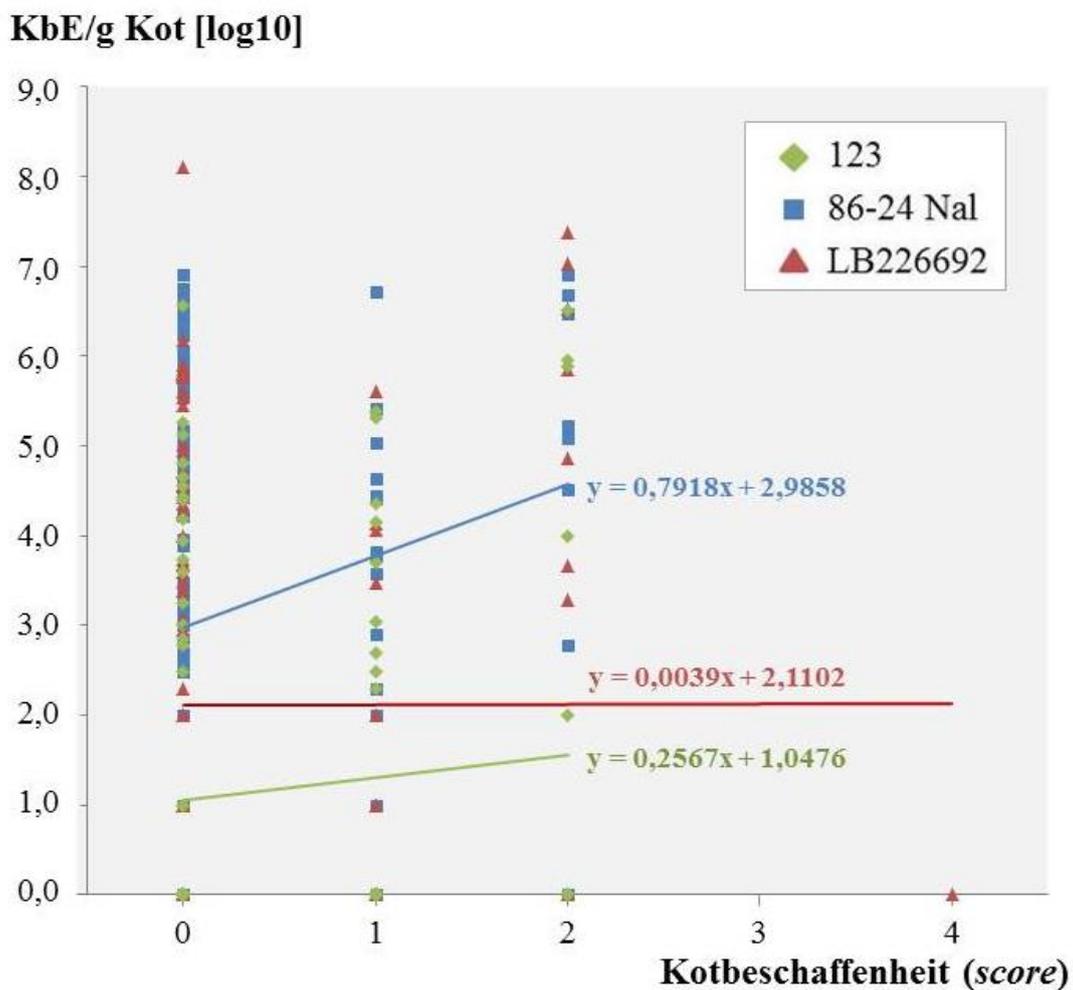


**Abb. 6: Quantifizierung der fäkalen Ausscheidung der Inokulationsstämm**  
 (A: TV1A, n = 3 Kälber/Gruppe; B: TV1B, n = 2 Kälber/Gruppe).  
 Bezeichnung der Tiergruppen siehe Legende zu Abb. 4. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler. **gestrichelte Linie**: Nachweisgrenze, **Pfeil**: Zeitpunkt der Inokulation, **KbE** = Kolonie-bildende Einheiten, **nm** = nachmittags, **vm** = vormittags

**A:****KbE/g Kot [log10]****B:****KbE/g Kot [log10]****Abb. 7:****Quantifizierung der fäkalen Ausscheidung der Inokulationsstäme**

(A: TV1, n = 5 Kälber/Gruppe; B: TV2, n = 5 Kälber/Gruppe). Bezeichnung der Tiergruppen siehe Legende zu Abb. 4. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler. Signifikanter Unterschied des Mittelwerts (Mann-Whitney U-Test (exakte Signifikanz),  $p < 0,05$ ) der Keimzahlen zwischen **a**: Tiergruppe inokuliert mit Stamm 123 zu Tiergruppe inokuliert mit Stamm 86-24 Nal, **b**: Stamm 123 vs. Stamm LB226692, **c**: Stamm 86-24 Nal vs. Stamm LB226692. **gestrichelte Linie**: Nachweisgrenze, **Pfeil**: Zeitpunkt der Inokulation, **KbE** = Kolonie-bildende Einheiten, **nm** = nachmittags, **vm** = vormittags

Es konnte keine Korrelation zwischen der ausgeschiedenen Keimzahl und der Kotkonsistenz festgestellt werden, bei Tieren, die mit Stamm 123 (Korrelationskoeffizienten nach Pearson  $r = 0,086$ ,  $p = 0,185$ ) oder Stamm LB226692 (Korrelationskoeffizienten nach Pearson  $r = 0,001$ ,  $p = 0,495$ ) inokuliert wurden (Abb. 8). Bei Tieren, die mit Stamm 86-24 Nal inokuliert wurden, bestand eine einseitig signifikante Korrelation zwischen der ausgeschiedenen Keimzahl und der Kotkonsistenz (Korrelationskoeffizienten nach Pearson  $r = 0,206$ ,  $p = 0,016$ ).



**Abb. 8:** Streudiagramm zum Zusammenhang der fäkalen Ausscheidung der Inokulationsstämme und der Kotbeschaffenheit. Bezeichnung der Tiergruppen siehe Legende zu Abb. 4. Lineare Trendlinie und Steigungsformel. **0:** normal, **1:** breiig, **2:** wässriger Durchfall, **3:** schleimiger Durchfall, **4:** blutiger Durchfall, **KbE** = Kolonie-bildende Einheiten

### 6.3.2 Nachweis der Inokulationsstämme in einzelnen Darmabschnitten

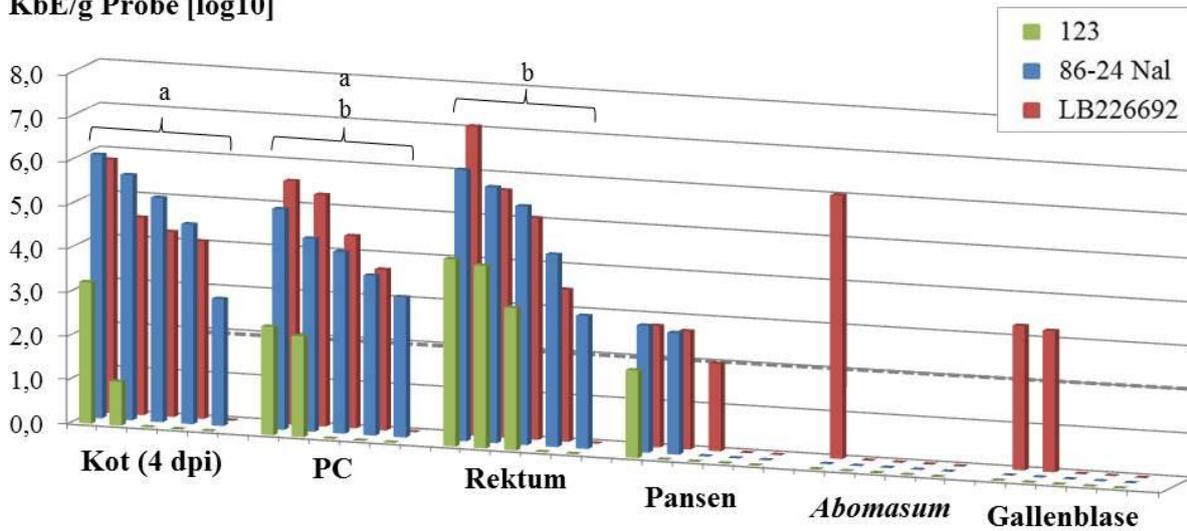
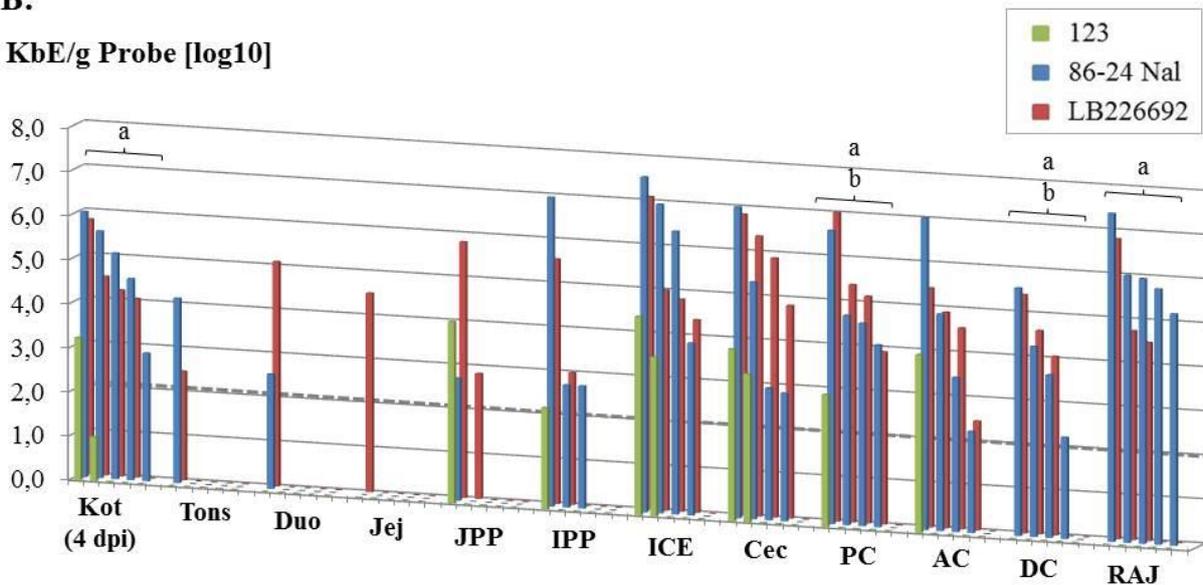
Im TV1 konnte der Stamm 123 4 dpi vereinzelt sowohl im Darminhalt als auch assoziiert mit dem Darmgewebe bis zu einer maximalen Keimzahl von  $3,2 \times 10^4$  KbE/g Probe nachgewiesen werden (Abb. 9). Dabei erfolgte der Nachweis bei einem Tier (Kalb 10) an den Peyer-Platten des Jejunums (JPP), den Peyer-Platten des Ileums (IPP), an der Ileozäkalklappe (ICE), im Zäkum, im proximalen Kolon und der *Ansa centralis*. Bei einem weiteren Tier (Kalb 11) konnte der negative Kontrollstamm an der ICE und im Zäkum, sowie im nachgewiesen werden. Die 3 übrigen Tiere wiesen den Stamm entweder nur im Inhalt des proximalen Kolons, des Rektums oder im Pansen auf.

Der Stamm 86-24 Nal war bei allen 5 Tieren in den Darminhaltsproben des Dickdarmes (proximales Kolon, rektoanale Übergangszone (*rectoanal junction*, RAJ)) bis  $1,6 \times 10^6$  KbE/g Darminhalt nachweisbar. Bei zwei Tieren (Kalb 4 und 5) gelang außerdem der Nachweis aus dem Pansen. Der positive Kontrollstamm konnte bei einzelnen Tieren an jeweils unterschiedlichen Lokalisationen assoziiert mit Dünndarmgewebe nachgewiesen werden. Bei einem Tier (Kalb 12) erfolgte der Nachweis im *Duodenum* und an den JPP, bei 3 weiteren Tieren (Kalb 4, 5 und 13) an den IPP. Im Übergang zum und im Dickdarm erfolgte der Nachweis mit Ausnahme von einem Tier (Kalb 6) bei allen Tieren an allen dort untersuchten Lokalisationen bis zu einer Keimzahl von  $4,1 \times 10^7$  KbE/g Darmgewebe. An der RAJ konnte der Stamm für alle 5 Tiere bis  $2,8 \times 10^7$  KbE/g Darmgewebe nachgewiesen werden.

Der Stamm LB226692 war ebenso bei allen 5 Tieren in den Darminhaltsproben des Dickdarmes bis  $5,6 \times 10^7$  KbE/g Darminhalt nachweisbar. Außerdem gelang bei 3 Tieren (Kalb 7, 8, und 9) der Nachweis aus dem Pansen, bei einem Tier (Kalb 9) aus Labmageninhalt und bei 2 Tieren (Kalb 7 und 8) aus dem Inhalt der Gallenblase. Auch der Stamm LB226692 konnte, ähnlich wie der Stamm 86-24 Nal, nur vereinzelt assoziiert mit Dünndarmgewebe nachgewiesen werden. Bei einem Tier (Kalb 14) erfolgte der Nachweis im *Duodenum*, an den JPP und den IPP, bei Kalb 15 im mittleren *Jejunum*, an den JPP und IPP. Bei Kalb 8 gelang der Nachweis nur assoziiert mit dem mittleren *Jejunum*. Im Übergang zum und im Dickdarm erfolgte der Nachweis mit Ausnahme von Kalb 8 bei allen Tieren an allen dort untersuchten Lokalisationen bis zu einer Keimzahl von  $1,3 \times 10^7$  KbE/g Darmgewebe. An der RAJ wurde der Stamm bei 3 Tieren (Kalb 7, 14 und 15) bis  $6,5 \times 10^6$  KbE/g Darmgewebe nachgewiesen.

Im TV1 konnte 4 dpi weder in den *Lymphonodi jejunalis* und *cecalis*, in der Leber, noch assoziiert mit dem Gewebe des *Abomasums* oder der Gallenblase einer der Inokulations-

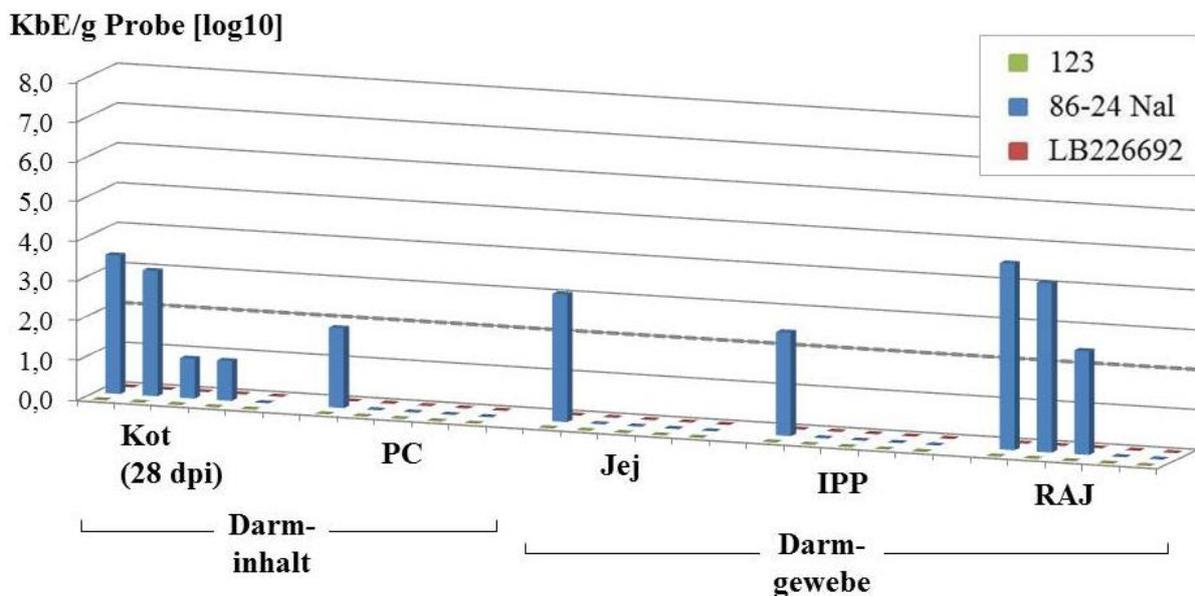
stämme nachgewiesen werden. Die ermittelte mittlere Keimzahl des Stammes 86-24 NaI unterschied sich im Vergleich zum Stamm 123 sowohl im Inhalt wie auch Gewebe-assoziiert im proximalen Kolon signifikant. Signifikante Unterschiede zwischen positivem und negativem Kontrollstamm wurden auch im distalen Kolon und an der RAJ festgestellt. Zwischen dem Stamm LB226692 und dem Stamm 123 zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der mittleren Keimzahl des Inhaltes und assoziiert zum Gewebe des proximalen Kolons, sowie im Inhalt des Rektums und Gewebe-assoziiert im distalen Kolon (Mann-Whitney U-Test (exakte Signifikanz),  $p < 0,05$ ).

**A:****KbE/g Probe [log10]****B:****KbE/g Probe [log10]**

**Abb. 9: Quantifizierung der Inokulationsstämme in einzelnen Darmabschnitten in TV1 (A: Darminhaltsproben, B: Darmgewebeproben).** Bezeichnung der Tiergruppen siehe Legende zu Abb. 4. Angabe der Einzelwerte pro Kalb (Reihung pro Lokalisation anhand der Höhe der KbE-Werte; gleiche Position eines Balkens entspricht nicht notwendigerweise einem bestimmten Tier). Signifikanter Unterschied des Mittelwerts (Mann-Whitney U-Test (exakte Signifikanz),  $p < 0,05$ ) der Keimzahlen zwischen **a**: Tiergruppe inokuliert mit Stamm 123 zu Tiergruppe inokuliert mit Stamm 86-24 Nal, **b**: Stamm 123 vs. Stamm LB226692. **gestrichelte Linie**: Nachweisgrenze, **AC** = *Ansa centralis*, **Cec** = Zäkum, **DC** = distales Kolon, **dpi** = Tage nach Inokulation, **Duo** = *Duodenum*, **ICE** = Ileozäkalklappe, **IPP** = Peyer-Platten des *Ileums*, **Jej** = *Jejunum*, **JPP** = Peyer-Platten des *Jejunums*, **KbE** = Kolonie-bildende Einheiten, **PC** = proximales Kolon, **RAJ** = *rectoanal junction*, **Tons** = Tonsille

Im TV2 erfolgte die Bestimmung der Keimzahlen 28 dpi (Abb. 10). Zu diesem Zeitpunkt konnte sowohl im Darminhalt, wie auch im Darmgewebe nur noch der Stamm 86-24 Nal nachgewiesen werden. Dabei gelang bei einem Tier (Kalb 24) der Nachweis aus dem proximalen Kolon und Gewebe-assoziiert aus dem mittleren *Jejunum*. Bei einem weiteren Tier (Kalb 25) gelang der Nachweis an das Gewebe des IPP assoziierter *E. coli* des Stammes 86-24 Nal. Bei 3 Tieren (Kalb 21, 22 und 25) konnte der Stamm 86-24 Nal an der RAJ nachgewiesen werden.

Weder im *Duodenum*, an den JPP, der ICE, im Zäkum, proximalen Kolon, der *Ansa centralis*, dem distalen Kolon, noch im Inhalt des Rektums und der Gallenblase konnte einer der Inokulationsstämme bakteriologisch nachgewiesen werden.



**Abb. 10:** Quantifizierung der Inokulationsstämme in einzelnen Darmabschnitten in TV2. Bezeichnung der Tiergruppen siehe Legende zu Abb. 4. Angabe der Einzelwerte pro Kalb (Reihung pro Lokalisation anhand der Höhe der KbE-Werte; gleiche Position eines Balkens entspricht nicht notwendigerweise einem bestimmten Tier). **gestrichelte Linie:** Nachweisgrenze, **dpi** = Tage nach Inokulation, **IPP** = Peyer-Platten des Ileums, **Jej** = *Jejunum*, **KbE** = Koloniebildende Einheiten, **PC** = proximales Kolon, **RAJ** = *rectoanal junction*

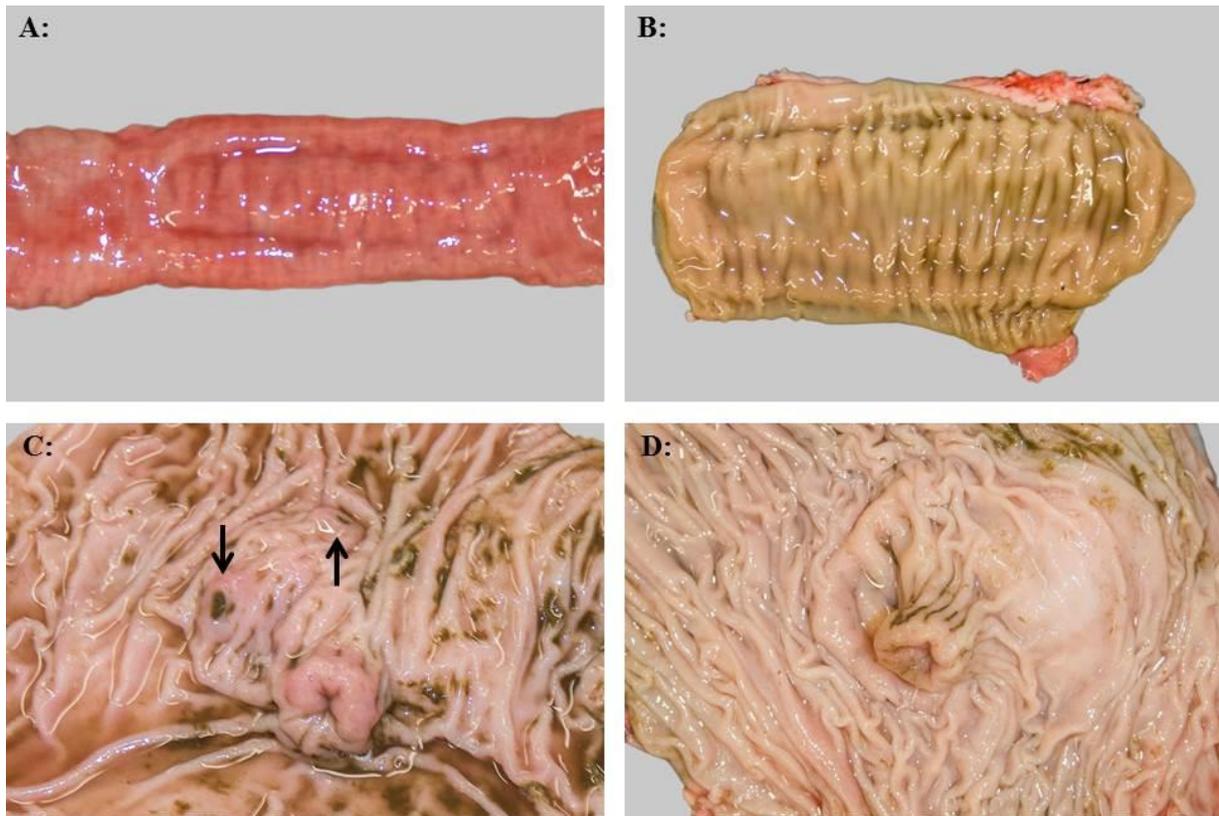
## 6.4 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung des Gewebes

Eine zusammenfassende Darstellung aller Versuchstiere mit makroskopischen Veränderungen findet sich in Tab. 16 (Seite 78).

### 6.4.1 Darmgewebe

Keines der Tiere des TV1 zeigte 4 dpi makroskopische Veränderungen der Darmschleimhaut des Dün- und Dickdarms. Die Schleimhaut stellte sich mit glatten bzw. mit verstreichbaren Falten versehen, rosa, feucht, glatt und glänzend dar. Bei 5 Tieren (Kalb 1, 8, 13, 14 und 15) zeigte sich eine Aktivierung des Darm-assoziierten Lymphgewebes (*gut-associated lymphoid tissue*; GALT) in einer Verdickung der Peyer-Platten des *Jejunums* (JPP) und des *Ileums* (IPP; Abb. 11, A und B), bei einem Tier (Kalb 8) auch in einer Dickenzunahme des Lymphgewebes an der Ileozäkalklappe (ICE). Bei Kalb 14 waren zwei Knoten (Ø 1 cm) im Bereich der ICE sicht- und palpierbar (Abb. 11, C). Bei 5 Tieren (Kalb 11– 15) konnten des Weiteren in großen Teilen des Dickdarmes etwa 1 cm lange, weiße, an beiden Seiten spitz zulaufende Nematoden diagnostiziert werden.

Auch im TV2 konnte 28 dpi keine makroskopischen Veränderungen der Darmschleimhaut diagnostiziert werden. Lediglich 2 Kälber (Kalb 27 und 28) zeigten eine Aktivierung des GALT, weitere 2 Kälber (Kalb 20 und 28) wiesen einen Nematodenbefall im Dickdarm auf.



**Abb. 11:** Darstellung makroskopischer Veränderungen des Darmgewebes.  
**A:** Kalb 14, Peyer-Platten des *Jejunums*, aktiviert, Inokulat: LB226692,  
**B:** Kalb 15, Peyer-Platten des *Ileums*, aktiviert, Inokulat: LB226692,  
**C:** Kalb 14, Ileozäkalklappe, zwei Knoten (Ø 1 cm) im Bereich der Ileozäkalklappe (Pfeile), Inokulat: LB226692,  
**A:** Kalb 15, Ileozäkalklappe, unverändert, Inokulat: LB226692

#### 6.4.2 Darminhalt

Bei allen Tieren lag im *Duodenum* dünnbreiiger, helloliver bis olivgrüner Darminhalt unterschiedlicher Menge vor. Die Schlingen des *Jejunums* und das *Ileum* waren unterschiedlich stark mit einem größtenteils dünnbreiigen dunkelolivnen Darminhalt gefüllt. Das Zäkum war mit viel dunkelolivnen Inhalt von dünnbreiiger bis breiiger Konsistenz gefüllt. Im proximalen Kolon lag der Darminhalt meist noch in breiiger Konsistenz vor, ab der *Ansa centralis* wurde er jedoch bei den meisten Tieren zunehmend fester und war ab dem distalen Kolon und im Rektum tierartspezifisch geformt und von dunkeloliver Farbe. Teilweise befand sich im Rektum jedoch auch kein Kot (Kalb 11 und 12) oder in dickbreiiger Konsistenz (Kalb 8, 10 und 14) ohne Formung.

### 6.4.3 Darmlymphknoten

Die *Lnn. jejunales* zeigten bei allen Tieren im TV1 eine feuchte und glatte Oberfläche, sie waren prall und gut abgegrenzt (Tab. 15). Die dunkle Rinde und das helle Mark waren gut abgrenzbar und die Schnittfläche geringgradig feucht. Bei zwei Tieren (Kalb 3 und 5) zeigte sich jedoch ein mittelgradiges Ödem, bei weiteren zwei Tieren (Kalb 6 und 13) waren die Lymphknoten vergrößert (auf bis zu 6 x 3 x 1,5 cm). Die *Lnn. cecales* waren bei zwei Tieren (Kalb 3 und 5) mittelgradig ödematös, bei weiteren zwei Tieren (Kalb 6 und 13) waren die Lymphknoten vergrößert (auf bis zu 6 x 3 x 1,5 cm).

Während der Sektion wurden auch weitere Lymphknoten des Magen-Darm-Traktes untersucht, eine genauere Erfassung erfolgte jedoch nur bei auffälligen Befunden. So konnte bei einem Tier eine Vergrößerung der *Lnn. anorectales* (Kalb 5) und bei einem weiteren Tier (Kalb 12) eine Vergrößerung der *Lnn. ruminales* (auf Ø 2 – 3 cm) und der *Lnn. hepatici* (auf Ø 1 – 2 cm) festgestellt werden.

Im TV2 waren bei 2 Tieren (Kalb 17 und 27) sowohl die *Lnn. jejunales* als auch die *Lnn. cecales* sehr prominent. Bei einem Tier (Kalb 19) waren die *Lnn. pancreaticoduodinales* hyperplastisch.

**Tab. 15:** Größe der Lymphknoten bei den Versuchstieren aus TV1

	Größe der Lymphknoten (in cm) nach Inokulationsgruppe		
	Stamm 123	Stamm 86-24 Nal	Stamm LB226692
<i>Ln. jejunalis</i>	Ø 1 - 2	Ø 1 - 3	Ø 1 - 2
<i>Ln. cecalis</i>	2 x 2 x 0,5 - 5 x 2 x 1,5	2 x 2 x 1 - 7 x 5 x 1,5	2 x 1,5 x 0,5 - 3,5 x 2 x 0,5
<i>Ln. popliteus</i>	1,5 x 1 x 1 - 2 x 2 x 1	2 x 2 x 1 - 3 x 2 x 1	1,5 x 1,5 x 1 - 2 x 2 x 1

#### **6.4.4 Makroskopische Befunde am übrigen Tierkörper**

##### **Körperlymphknoten**

Die *Lnn. poplitei* zeigten bei allen Tieren im TV1 eine feuchte und glatte Oberfläche, sie waren prall und gut abgegrenzt (Tab. 15). Die dunkle Rinde und das helle Mark waren gut abgrenzbar und die Schnittfläche geringgradig feucht. Bei einem Tier (Kalb 5) zeigte sich jedoch ein mittelgradiges Ödem, bei einem weiteren Tier (Kalb 12) war der Lymphknoten vergrößert (auf 2 x 2 x 2 cm). Im TV2 waren bei 2 Tieren (Kalb 17 und 27) die *Lnn. poplitei* sehr prominent.

##### **Brustorgane**

Bei 3 Tieren (Kalb 4, 14 und 29) konnte in der Nasenöffnung und in der Trachea eine moderate Menge an eitrigem Sekret nachgewiesen werden.

Bei 25 Tieren (Kalb 1, 2, 4, 5, 7 – 15, 16 – 20, 22, 23, 25, 26, 28 - 30) konnten zum Teil hochgradige Veränderungen an der Lunge, die dem Bild einer enzootischen Bronchopneumonie entsprachen, festgestellt werden. Die Veränderungen betrafen unterschiedliche Anteile der Lunge. Bevorzugt betroffen waren die Spitzenlappen, sowie der kranioventrale Bereich der Hauptlappen, welche in unterschiedlichem Ausmaß leicht derb und von leberartiger Konsistenz (hepatisiert) waren. Zudem waren sie dunkel verfärbt. Die anderen rechten Lungenlappen waren voluminös, von lachsrosa bis grauer Farbe und puffig. Einige Kälber wiesen multiple, unregelmäßig verteilte rötliche Herde in den kranioventral gelegenen Lungenabschnitten auf. Diese besaßen meist Lappchengröße und waren zentral eitrig oder nekrotisch. Die Schnittfläche war feucht und es ließ sich eitriges Sekret abpressen. Die Konsistenz war prall, elastisch. Es fanden sich weiterhin Bindegewebszubildungen und blasige Gebilde.

Eine Mitbeteiligung der Pleura über den entzündlich veränderten Lungenbereichen führte bei 4 Tieren (Kalb 2, 4, 7 und 20) zu einer fibrinösen Pleuritis mit rauer Oberfläche, und es zeigten sich rötliche, fädige Auflagerungen, die nicht ablösbar waren. Weiterhin war das Lungenfell an einigen Stellen mit dem Brustfell fest verwachsen.

Bei 6 Tieren (Kalb 3, 5, 6, 22, 26 und 28) konnte am Herzbeutel eine Nischenperikarditis festgestellt werden.

**Bauchorgane**

Bei 2 Tieren (Kalb 3 und 4) zeigte sich eine Hyperämie der Milz, bei einem Tier (Kalb 2) eine geringgradige pulpäre Hypoplasie und bei einem weiteren Tier (Kalb 27) fibroblastische Auflagerungen auf der Milz. Bei 2 Tieren waren Kapselhyalinosen (Kalb 23) bzw. Kapselfibrosen ( $\varnothing$  ca. 4 cm) (Kalb 27) auf der Leberoberfläche feststellbar. Bei 2 Tieren (Kalb 4 und 27) zeigte sich eine chronische fibroblastische Peritonitis im Großen Netz.

**Tab. 16:** Makroskopische Veränderungen der Versuchstiere

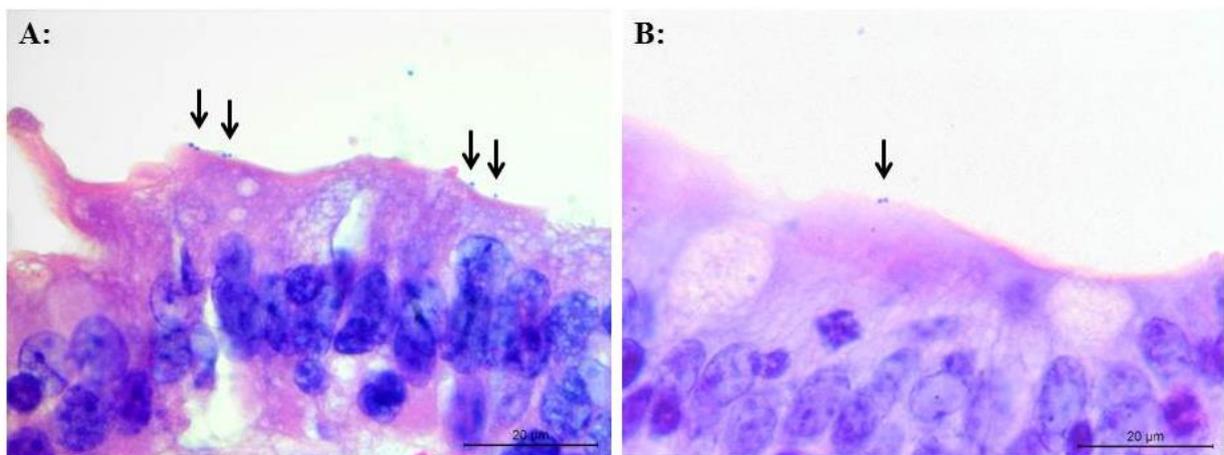
	Nummer der Versuchstiere mit positivem Befund nach Teilversuch und Inokulationsgruppe					
	TV1 (4 dpi)			TV2 (28 dpi)		
	Stamm 123	Stamm 86-24 Nal	Stamm LB226692	Stamm 123	Stamm 86-24 Nal	Stamm LB226692
Aktivierung des GALT	1	13	8, 14, 15	-	-	27, 28
Knoten an der ICE	-	-	14	-	-	-
Nematodenbefall	11	12, 13	14, 15	20	-	28
Veränderungen der <i>Lnn.</i>						
<i>Lnn. jejunales</i>	3	5, 6, 13	-	17	-	27
<i>Lnn. cecales</i>	3	5, 6, 13	-	17	-	27
<i>Lnn. anorectales</i>	-	5	-	-	-	-
<i>Lnn. ruminales</i>	-	12	-	-	-	-
<i>Lnn. hepatici</i>	-	12	-	-	-	-
<i>Lnn. pancreaticoduodenales</i>	-	-	-	19	-	-
<i>Lnn. poplitei</i>	-	5, 12	-	17	-	27
eitriger Nasenausfluss	-	4	14	-	-	29
enzootische Bronchopneumonie	1, 2, 10, 11	4, 5, 12, 13	7, 8, 9, 14, 15	16 - 20	22, 23, 25	26, 28, 29, 30
fibrinöse Pleuritis	2	4	7	20	-	-
Nischenperikarditis	3	5, 6	-	-	22	26, 28
Veränderungen der Milz	2, 3	4	-	-	-	27
Leberkapselhyalinose/ -fibrose	-	-	-	-	23	27
fibroblastische Peritonitis	-	4	-	-	-	27

**Erläuterung:** - kein positiver Befund, **dpi** = Tage nach Inokulation, **GALT** = Darm-assoziiertes Lymphgewebes, **ICE** = Ileozäkalklappe, *Lnn.* = *Lymphonodi*, **TV** = Teilversuch

## 6.5 Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchung

### 6.5.1 Darmwand und Schleimhaut-assoziiertes Lymphgewebe

In allen drei Versuchsgruppen des TV1 konnten bei allen Tieren in der HE-Färbung Epithel-assoziierte Bakterien nachgewiesen werden, wie in Abb. 12 exemplarisch dargestellt. Diese konnten jedoch nur in wenigen Fällen (siehe unten) in der immunhistologischen Färbung spezifisch angefärbt werden.



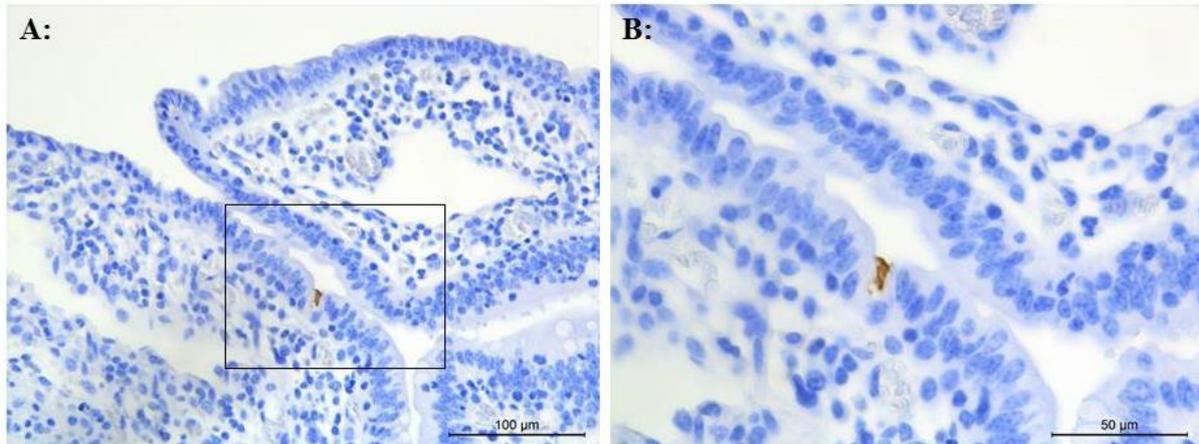
**Abb. 12:** **Histologische Darstellung Epithel-assoziiierter Bakterien** (Pfeile, HE-Färbung)  
**A:** Kalb 5, proximales Kolon, Inokulat: 86-24 Nal,  
**B:** Kalb 7, Peyer-Platten des *Ileums*, Inokulat: LB226692

In der immunhistologischen Färbung konnte der Stamm 86-24 Nal bei einem Tier (Kalb 13) an den IPP nachgewiesen werden (Abb. 13). Bei einem Tier (Kalb 5) konnten sowohl an den JPP als auch an den IPP markierte Strukturen im Bereich der Epithelzellen detektiert werden, deren Zugehörigkeit zu dem Inokulationsstamm und Interaktion mit den Epithelzellen nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte (Abb. 14). Im Bereich der JPP konnte diesen Strukturen eine Größe von 1,14 bis 1,39 µm zugeordnet werden. Diese Lokalisationen wurden als fraglich gewertet.

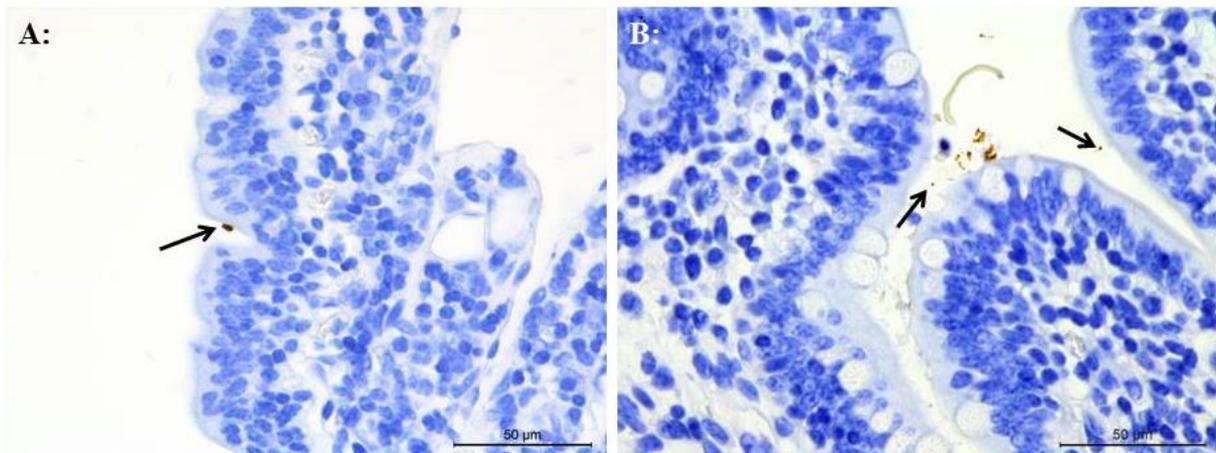
Bei 3 Tieren (Kalb 4, 12 und 13) gelang der Nachweis adhätierender Bakterien im ICE (Abb. 15 - 17). Bei Kalb 12 zeigten sich spezifisch markierte adhätierende Bakterien im ICE (Abb. 16, A und B), welche fokal im Inneren eines lymphoglandulären Komplexes auf dem Follikel-

assoziierten Epithel nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren konnten bei 3 Kälbern (Kalb 5, 6 und 13) adhärierende Bakterien an der RAJ detektiert werden (Abb. 18 - 20). Dabei wurden die Enterozyten der Rektumschleimhaut häufiger besiedelt als das verhornende Plattenepithel des Analkanals. Bei einem Tier (Kalb 12) konnten im Exsudat einer eitrigen Proktitis einzelne spezifisch markierte Bakterien detektiert werden. So gelang bei jedem der 5 histologisch untersuchten Kälber an mindestens einer Lokalisation der Nachweis von spezifisch markierten adhärierenden Bakterien auf den Darmepithelzellen (Tab. 17). Diese lagen an den Adhäsionsstellen meist in Form von Mikrokolonien vor.

**Abb. 13 – 14: Immunhistologischer Nachweis des Stammes 86-24 Nal an den Peyer-Platten des Jejunums (JPP) und des Ileums (IPP)**



**Abb. 13:** **A:** Kalb 13, IPP, Inokulat: 86-24 Nal; Kolonie aus mehreren spezifisch markierten adhärenierenden Bakterien (Kasten)  
**B:** Ausschnittsvergrößerung aus A



**Abb. 14:** **A:** Kalb 5, JPP, Inokulat: 86-24 Nal; fraglich markierte Struktur im Bereich der Epithelzellen (Pfeil)  
**B:** Kalb 5, IPP, Inokulat: 86-24 Nal; fraglich markierte Strukturen im Darm-lumen (Pfeile)

**Abb. 15 - 17: Immunhistologischer Nachweis des Stammes 86-24 Nal an der Ileozäkalklappe (ICE; nächste Seite)**

**Abb. 15:**     **A:** Kalb 4, ICE, Inokulat: 86-24 Nal; lymphoglandulärer Komplex in der Peyer-Platte der ICE, positive Markierungen in einem Pfropf aus neutrophilen Granulozyten und Zelldetritus in dem in die Tiefe ziehenden Epithelschlauch (Kasten),  
              **B:** Ausschnittsvergrößerung aus A (spezifische markierte Bakterien mit Pfeilen markiert)

**Abb. 16:**     **A:** Kalb 12, ICE, Inokulat: 86-24 Nal; Kolonie aus mehreren spezifisch markierten adhätierenden Bakterien (Kasten),  
              **B:** Ausschnittsvergrößerung aus A

**Abb. 17:**     **A:** Kalb 13, ICE, Inokulat: 86-24 Nal; Kolonie aus mehreren spezifisch markierten adhätierenden Bakterien (Kasten),  
              **B:** Ausschnittsvergrößerung aus A

Abb. 15:

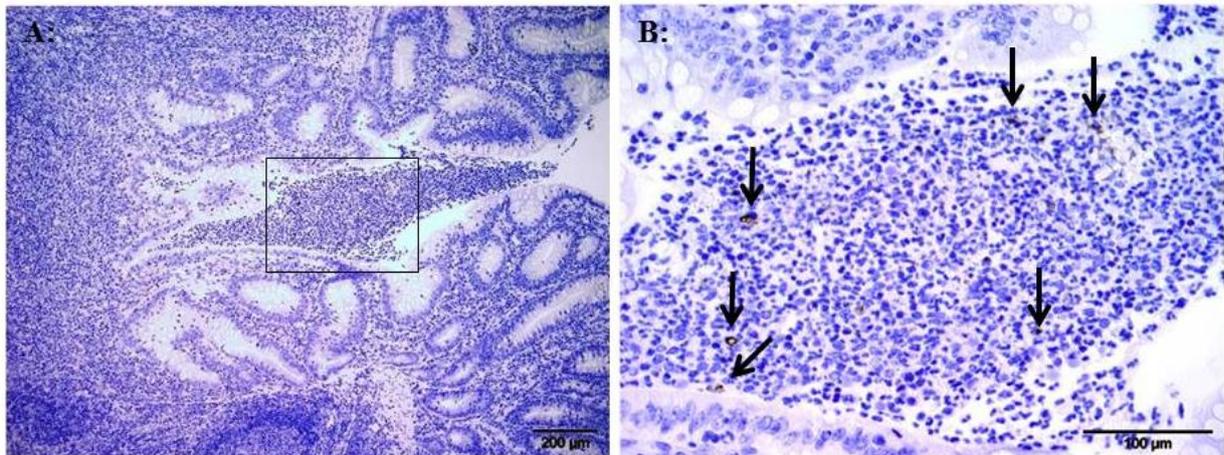


Abb. 16:

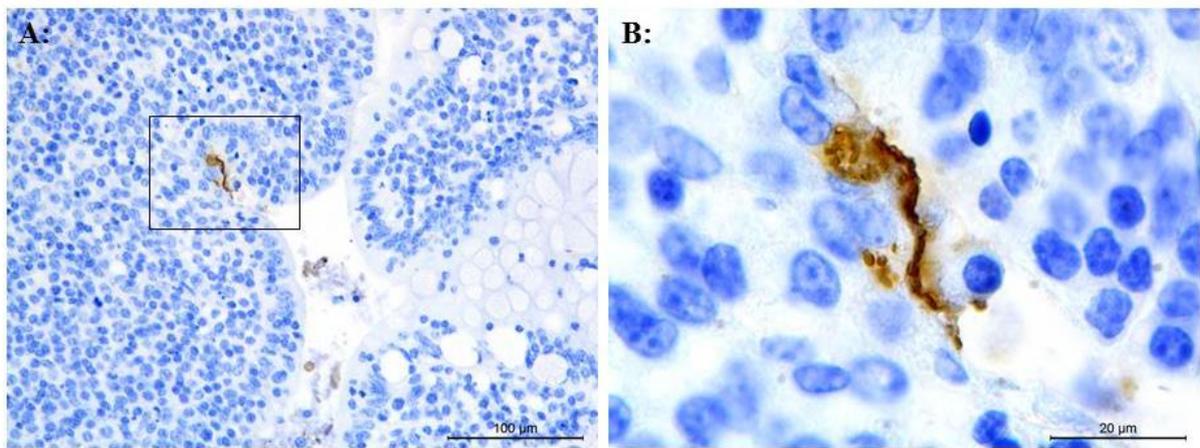
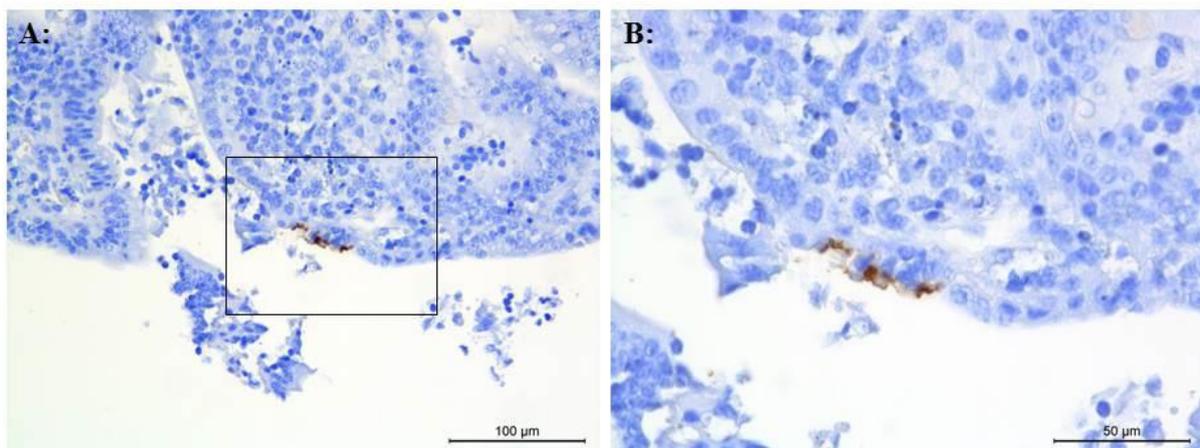


Abb. 17:



**Abb. 18 - 20: Immunhistologischer Nachweis des Stammes 86-24 Nal an der *rectoanal junction* (RAJ; nächste Seite)**

**Abb. 18:** **A:** Kalb 5, RAJ, Inokulat: 86-24 Nal; spezifisch markierte adhärierende Bakterien genau am Übergang von Rektumschleimhaut (rechts) in Analschleimhaut (links), einzelne Bakterien liegen zwischen den Hornschuppen der Analschleimhaut und im lumennahen Bereich einer Krypte der Rektumschleimhaut (Kasten)  
**B:** Ausschnittsvergrößerung aus A (spezifische markierte Bakterien mit Pfeilen markiert)

**Abb. 19:** **A:** Kalb 13, RAJ, Inokulat: 86-24 Nal; Kolonie aus mehreren spezifisch markierten adhärierenden Bakterien auf den Enterozyten der Rektumschleimhaut (Kasten)  
**B:** Ausschnittsvergrößerung aus A

**Abb. 20:** **A:** Kalb 13, RAJ, Inokulat: 86-24 Nal; Kolonie aus mehreren spezifisch markierten adhärierenden Bakterien genau im Bereich eines Übergang von Rektumschleimhaut (rechts und links) in Analschleimhaut (mittig, Pfeil), die Kolonie adhärierender positiv markierte Bakterien befindet sich auf Enterozyten der Rektumschleimhaut, einzelne positiv markierte Bakterien liegen zwischen den abschilfernden Hornschuppen der Analschleimhaut (Kasten),  
**B:** Ausschnittsvergrößerung aus A

Abb. 18:

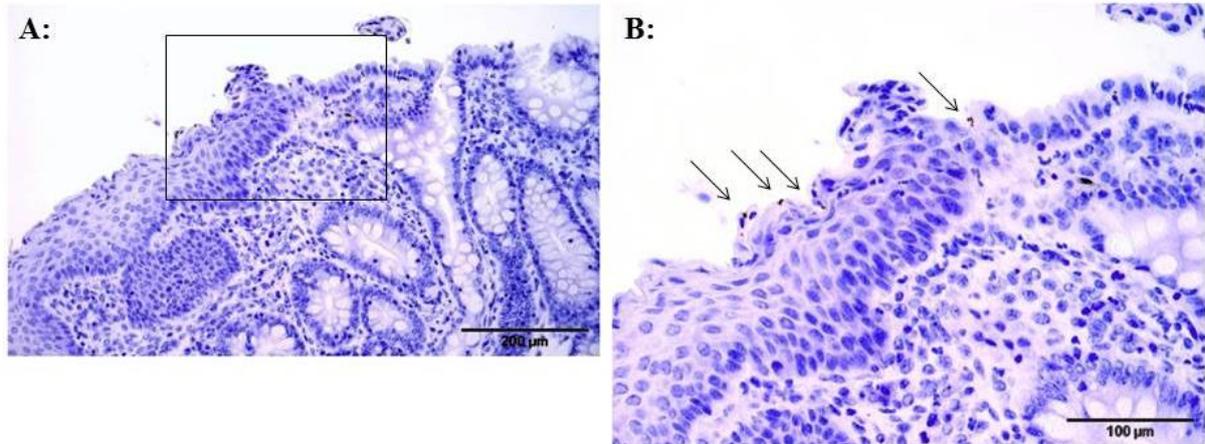


Abb. 19:

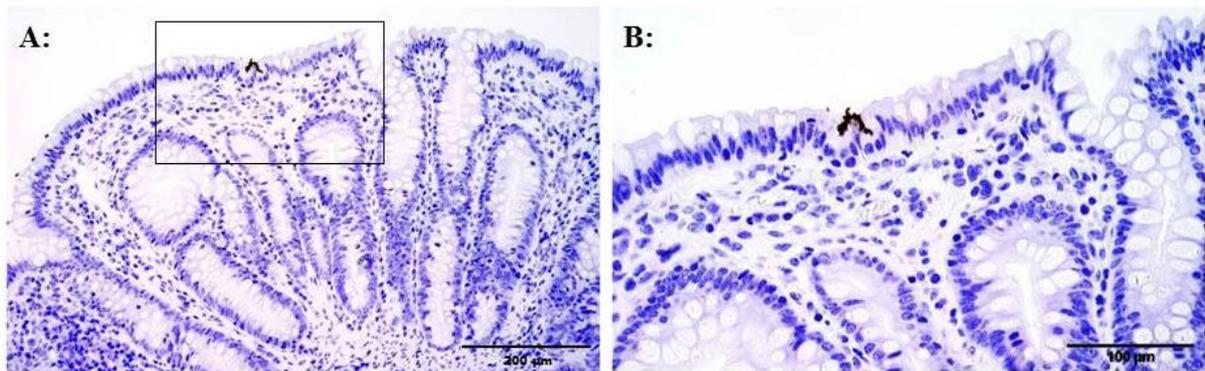
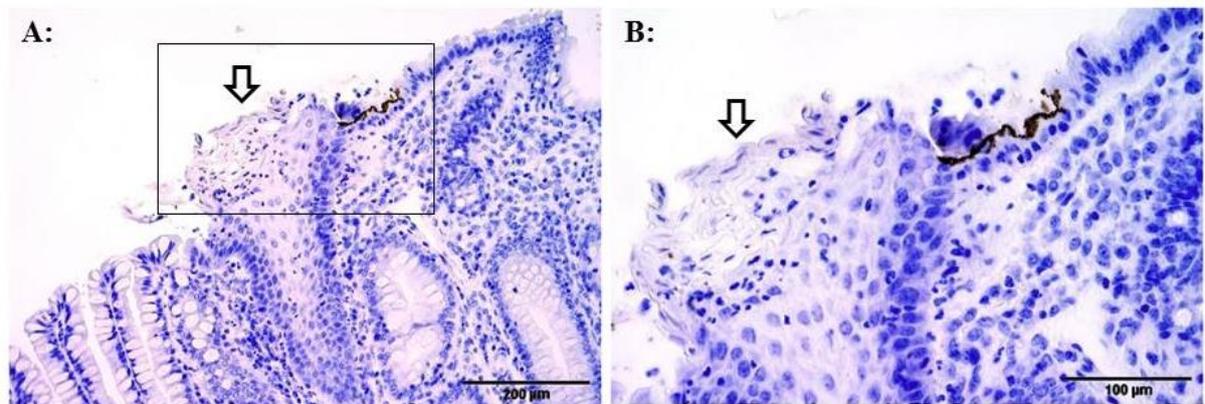


Abb. 20:



Adhärierende Bakterien des Stammes LB226692 konnten bei einem Tier (Kalb 14) an der RAJ nachgewiesen werden (Abb. 21 - 23). Diese befanden sich an abgelösten Hornschuppen des Epithels oder an der Epitheloberfläche der Analschleimhaut. Im Bereich der Rektumschleimhaut war keine bakterielle Adhäsion zu beobachten. Die an die Epitheloberfläche adhärierenden Bakterien lagen einzeln und bildeten keine Kolonien. Bei Kalb 14 traten des Weiteren im ICE massiv spezifisch angefärbte Bakterien an der darmlumenseitigen Öffnung eines Kryptabszesses (zystische Veränderung des lymphoglandulären Komplexes) auf. Die spezifisch markierten Bakterien befanden sich frei zwischen überwiegend neutrophilen Granulozyten (Abb. 24). Bei selbigem Tier traten auch im Exsudat einer ulzerativen Proktitis einzelne spezifisch markierte Bakterien auf. Eine unregelmäßige Oberfläche in der HE-Übersichtsfärbung deutet des Weiteren auf Verhornungsstörungen in diesem Bereich bei diesem Tier hin. Bei 2 Tieren (Kalb 7 & 15) konnten des Weiteren im JPP, bei 1 Tier im IPP (Kalb 14) und bei 1 Tier im Zäkum (Kalb 8) auch einzeln gelegene, markierte Strukturen aufgezeigt werden, deren Zugehörigkeit zu dem Inokulationsstamm und Interaktion mit den Epithelzellen nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte (Abb. 25 und 26). Diese Lokalisationen wurden als fraglich gewertet. Weitere fragliche Lokalisationen traten bei 3 Tieren (Kalb 7, 8 und 14) in der Gallenblase auf (Abb. 27 - 29). Bei jedem der mit dem Stamm LB226692 inokulierten 5 Tiere gelang außerdem der Nachweis spezifisch angefärbter Bakterien im Darmlumen bzw. der Ingesta (nicht gezeigt).

**Abb. 21 -23: Immunhistologischer Nachweis des Stammes LB226692 an der *rectoanal junction* (RAJ; nächste Seite)**

- Abb. 21:** **A:** Kalb 14, RAJ, Inokulat: LB226692, HE-Färbung; adhärierende Bakterien (Pfeile) an abgeschilferten Epithelschuppen in der HE-Übersichtsfärbung  
**B:** Kalb 14, RAJ, Inokulat: LB226692, IH-Färbung; zahlreiche spezifisch markierte adhärierende Bakterien (Pfeile) an abgeschilferten Epithelschuppen der Analschleimhaut
- Abb. 22:** **A:** Kalb 14, RAJ, Inokulat: LB226692; zahlreiche spezifisch markierte adhärierende Bakterien an abgeschilferten Epithelschuppen und einzelne an der Epitheloberfläche der Analschleimhaut (Kasten)  
**B:** Ausschnittsvergrößerung aus A (einzelne spezifisch markierte, an der Schleimhautoberfläche adhärierende Bakterien mit Pfeilen markiert)
- Abb. 23:** **A und B:** Kalb 14, RAJ, Inokulat: LB226692; einzelne spezifisch markierte adhärierende Bakterien an abgeschilferten Epithelschuppen (offener Pfeil) und an der Epitheloberfläche der Analschleimhaut (Pfeil)

Abb. 21:

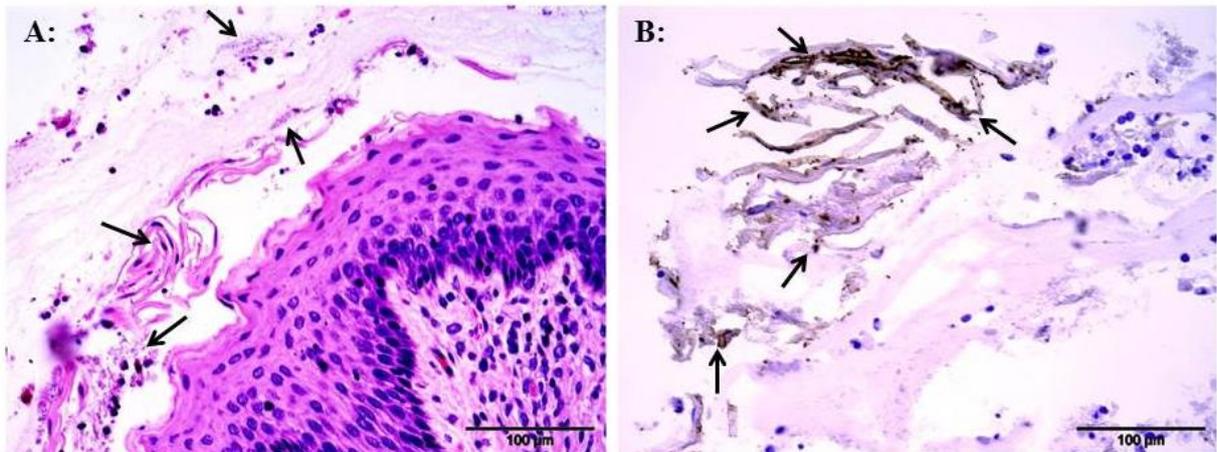


Abb. 22:

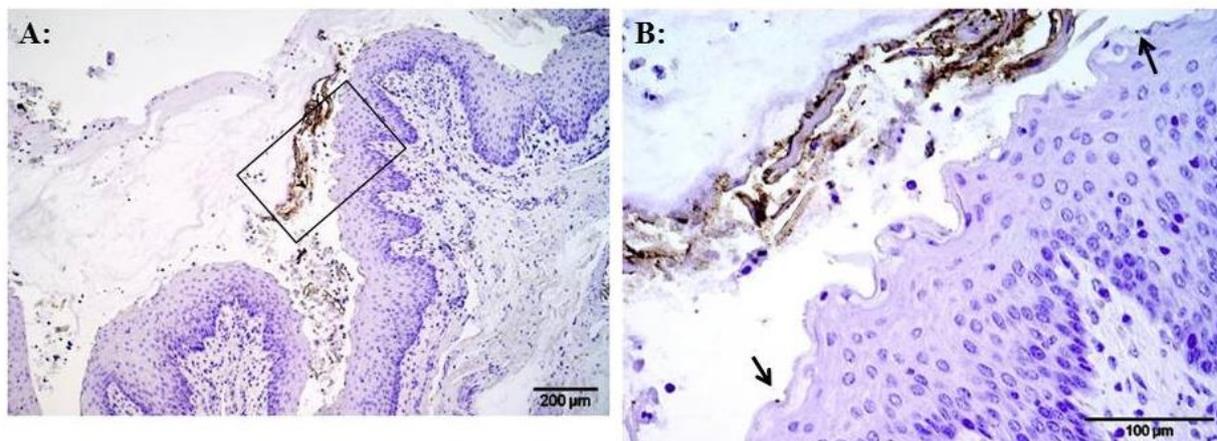
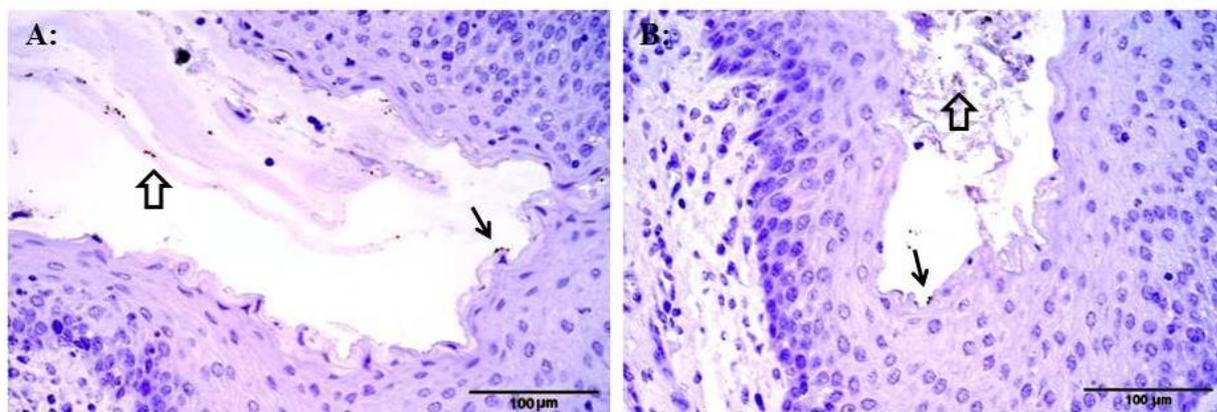


Abb. 23:



**Abb. 24 - 26: Immunhistologischer Nachweis des Stammes LB226692 in verschiedenen Darmabschnitten** (nächste Seite)

**Abb. 24:** **A:** Kalb 14, Ileozäkalklappe, Inokulat: LB226692; massiv spezifisch markierte Bakterien an der darmlumenseitigen Öffnung eines Kryptabszesses (zystische Veränderung des lymphoglandulären Komplexes), Bakterien befinden sich frei zwischen den überwiegend neutrophilen Granulozyten (Kasten)  
**B:** Ausschnittsvergrößerung aus A

**Abb. 25:** **A:** Kalb 7, Peyer-Platten des *Jejunums*, Inokulat: LB226692; markierte Struktur im Bereich der Epithelzellen (Pfeil)  
**B:** Kalb 15, Peyer-Platten des *Jejunums*, Inokulat: LB226692; markierte Struktur im Bereich der Epithelzellen (Pfeil)

**Abb. 26:** **A:** Kalb 14, Peyer-Platten des *Ileums*, Inokulat: LB226692; markierte Struktur im Bereich der Epithelzellen (Pfeil)  
**B:** Kalb 8, Zäkum, Inokulat: LB226692; markierte Strukturen im Bereich der Epithelzellen (Pfeil)

Abb. 24:

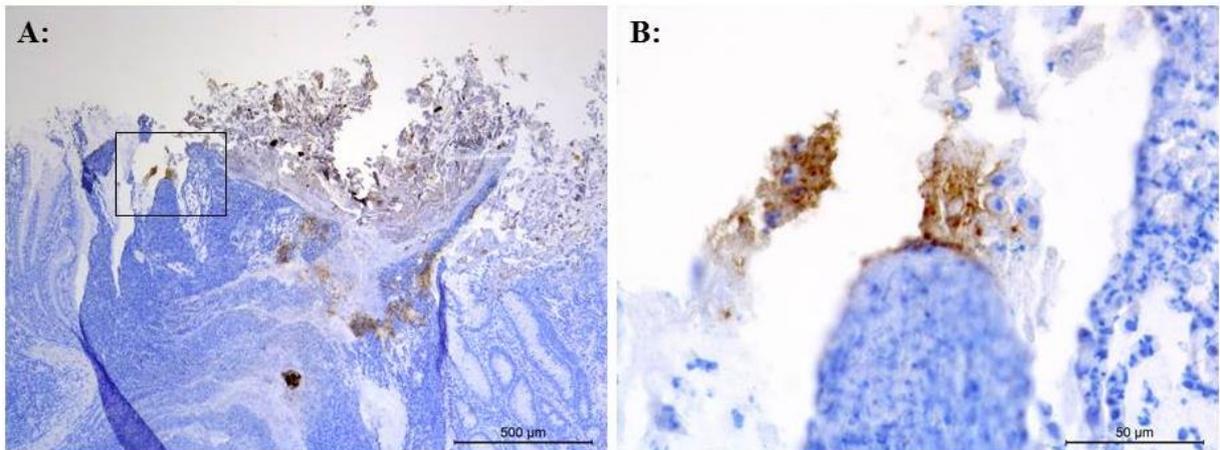


Abb. 25:

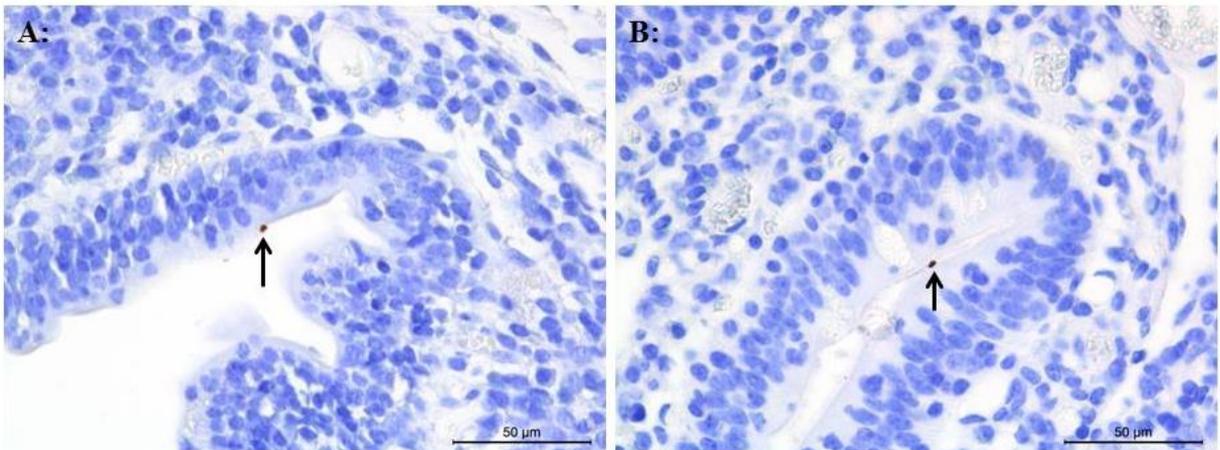
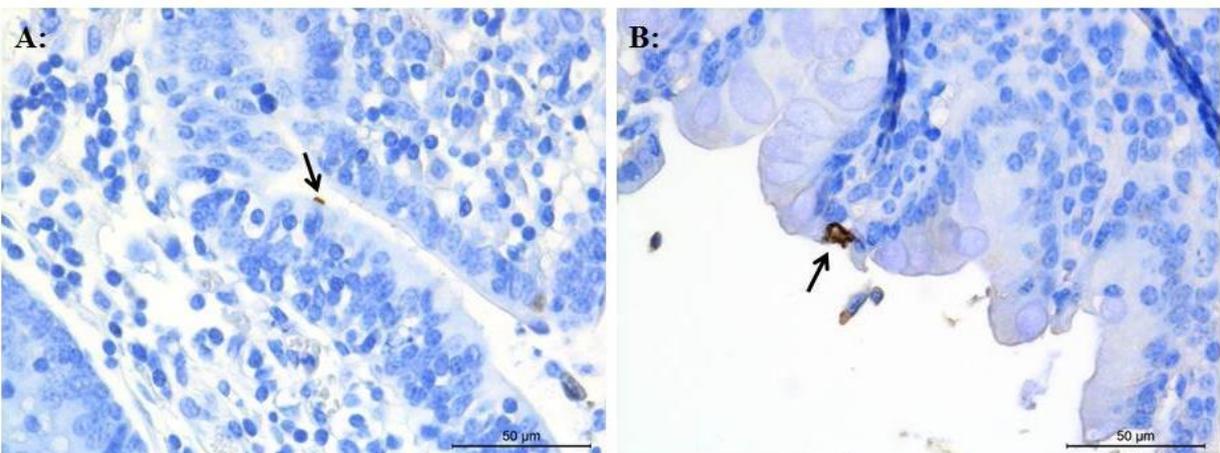


Abb. 26:



**Abb. 27 - 29: Immunhistologischer Nachweis des Stammes LB226692 in der Gallenblase**  
(nächste Seite)

**Abb. 27:**     **A:** Kalb 7, Gallenblase, Inokulat: LB226692; zahlreiche markierte Strukturen (Kasten) an abgeschilferten Epithelschuppen  
                  **B:** Ausschnittsvergrößerung aus A

**Abb. 28:**     **A:** Kalb 8, Gallenblase, Inokulat: LB226692; markierte Struktur im Bereich der Epithelzellen (Pfeil)  
                  **B:** Ausschnittsvergrößerung aus A

**Abb. 29:**     Kalb 14, Gallenblase, Inokulat: LB226692; markierte Struktur im Bereich der Epithelzellen (Pfeil)

Abb. 27:

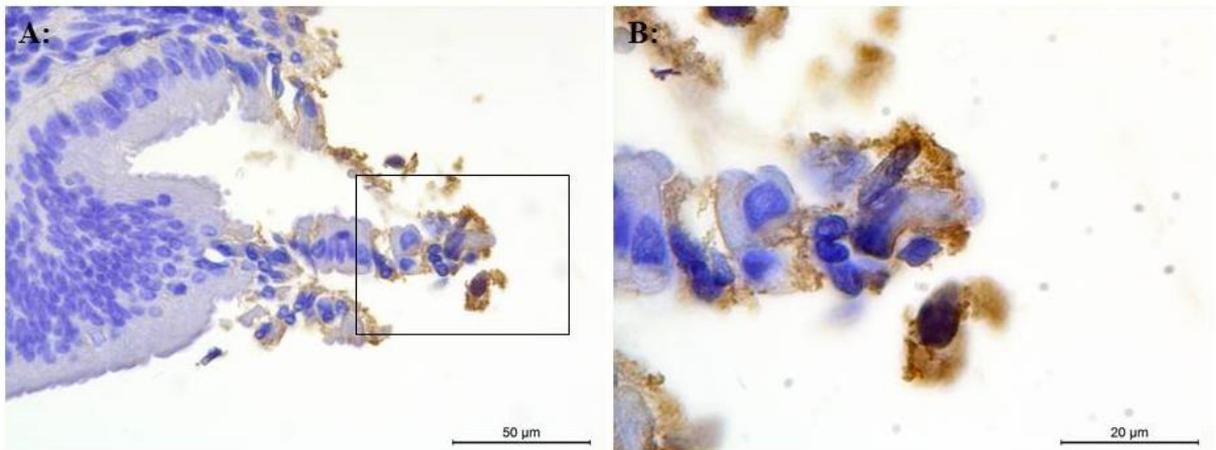


Abb. 28:

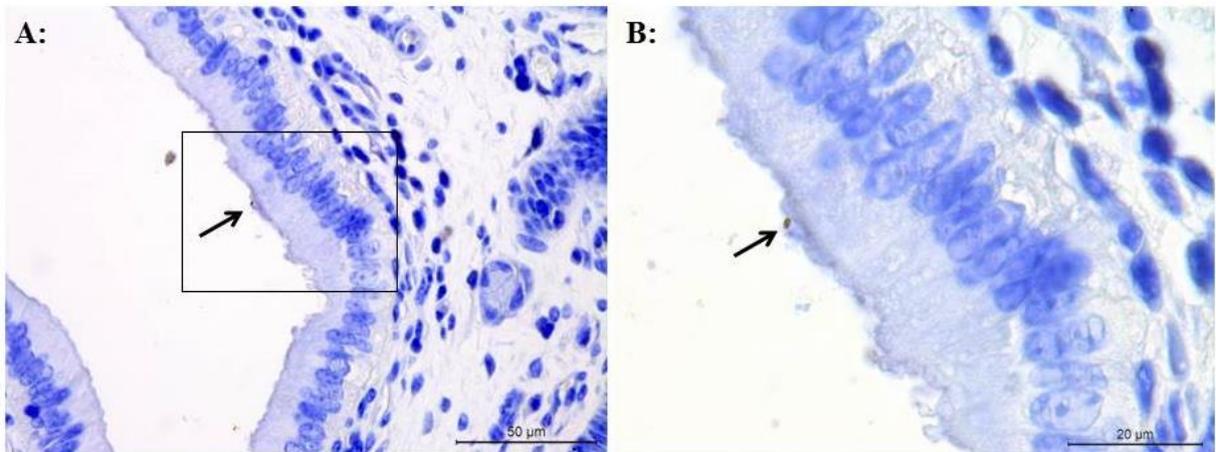


Abb. 29:



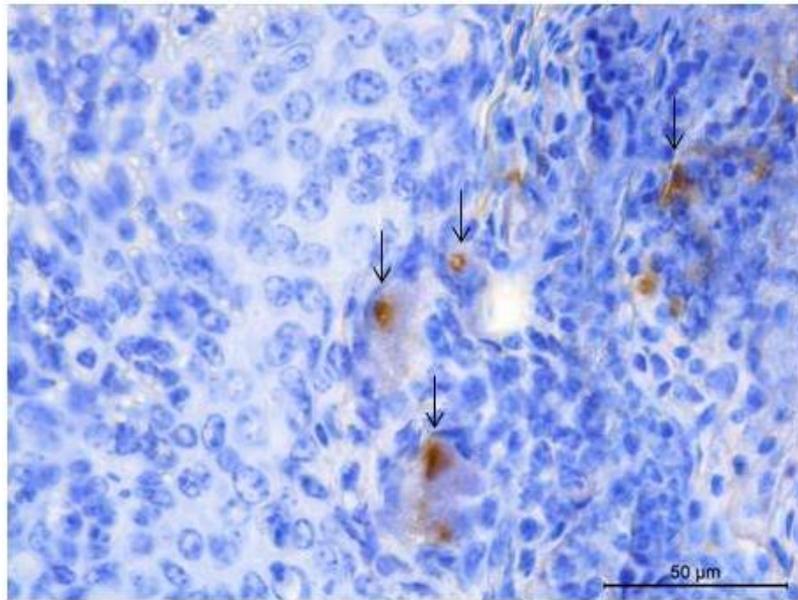
**Tab. 17:** Immunhistologischer Nachweis spezifisch markierter adhärenter Bakterien

Lokalisation	Anzahl der Tiere mit positivem oder fraglichem Nachweis nach Inokulationsgruppe			
	86-24 Nal		LB226692	
	positiv	fraglich	positiv	fraglich
<i>Duodenum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
Mittleres <i>Jejunum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
Peyer-Platten des <i>Jejunums</i>	0/5	1/5	0/5	2/5
Peyer-Platten des <i>Ileums</i>	1/5	1/5	0/5	1/5
Ileozäkalklappe	3/5	0/5	0/5	0/5
Zäkum	0/5	0/5	0/5	1/5
proximales Kolon	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Ansa centralis</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
distales Kolon	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>rectoanal junction</i>	3/5	0/5	1/5	0/5
Gallenblase	0/5	0/5	0/5	3/5

Bei allen 15 Tieren konnten in verschiedenen Lokalisationen des Darmes Kryptabszesse nachgewiesen werden. Bei 4 Tieren (Kalb 5, 6, 12 und 13) waren Entwicklungsstadien von Kokzidien im Darmepithel des Dickdarmes nachweisbar. Diese stellten sich als gekörnte runde Gebilde von eosinophiler bis hell violetter Farbe im Epithel liegend dar. Das Auftreten von Kokzidien war mit einer vermehrten Infiltration der Lamina propria mit eosinophilen Granulozyten vergesellschaftet.

### 6.5.2 Übrige histologisch untersuchte Organe

Bei allen 15 Tieren des TV1 konnte mikroskopisch eine eitrig **Tonsillitis** festgestellt werden. Diese war charakterisiert durch Kryptabszesse mit hochgradiger Einlagerung von Granulozyten, abgeschilferten Epithel und Kalkeinlagerungen (Detrituspfröpfe), sowie reaktiven Lymphfollikeln. Teilweise erfolgte eine Transmigration der Granulozyten durch das Tonsillarepithel. Es handelte sich um ein oberflächliches Geschehen unter Beteiligung bakterieller Erreger. Bei einem Tier (Kalb 14) konnten spezifisch markierte *E. coli* des Stammes LB226692 im Nekrosebereich einer Tonsillarkrypte (Kryptabszess) nachgewiesen werden (Abb. 30). Neben den spezifisch markierten Bakterien befanden sich an dieser Lokalisation auch viele nicht markierte Bakterien.



**Abb. 30:** Immunhistologischer Nachweis des Stammes LB226692 in der Tonsille (Pfeile), Kalb 14, Tonsille, Inokulat: LB226692

Bei 13 Tieren (Kalb 1, 2, 4, 5, 7 – 15) konnten neben den makroskopischen Veränderungen der **Lunge** auch histologische Veränderungen, die mit einer enzootischen Bronchopneumonie einhergehen, festgestellt werden. Diese zeigten sich durch zahlreiche Granulozyten in Bronchien, Bronchiolen (*Bronchiolitis obliterans*) und Alveolen. Teilweise kam es zu einem alveolären Ödem und der Einlagerung von Fibrinnetzen in die Alveolen. Parallel dazu konnte ein hochgradig aktiviertes bzw. hyperplastisches Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT) beobachtet werden. Bei einigen Tieren kam es zu einer Verdickung bzw. Fibrinbelägen auf der Pleura (chronisch proliferative Pleuritis).

Bei 6 Tieren (Kalb 6 – 9, 12, 13) konnten im Pansen intrakorneale Mikroabszesse nachgewiesen werden. Die oberste Hornschicht war zum Teil abgeschilfert und es kam zu einer Para- bzw. Hyperkeratose.

## 6.6 Vergleich zwischen den bakteriologischen, makroskopischen und histologischen Befunden

Ein positiver Nachweis spezifisch markierter adhärerender Bakterien in der Immunhistologie ging auch immer mit einem positivem Nachweis des entsprechenden Inokulationsstammes in der bakteriologischen Untersuchung einher (Tab. 19). Umgekehrt führte ein positiver bakteriologischer Nachweis nur in 23 % (Stamm 86-24 Nal) bzw. 3 % (Stamm LB226692) der Fälle auch zu einem positivem immunhistologischen Nachweis. In der Immunhistologie als fraglich gewertete Lokalisationen hatten zu 56 % auch einen positiven bakteriologischen Nachweis. Ein positiver immunhistologischer Nachweis erfolgte im Mittel bei einer Keimzahl von  $1,14 \times 10^7$  KbE/g Darmgewebe, in Einzelfällen jedoch auch bei einer Keimzahl von  $8,10 \times 10^3$  KbE/g Darmgewebe (Tab. 18). Der Nachweis spezifisch markierter Bakterien im Darmlumen bzw. der Ingesta korrelierte mit dem positiven bakteriologischen Nachweis im Inhalt des PC oder des Rektums, im Kot, sowie Gewebe-assoziiert.

**Tab. 18:** Bakteriologischer Nachweis der Inokulationsstämme in einzelnen Darmabschnitten mit immunhistologisch positivem Nachweis spezifisch markierter Bakterien

Lokalisation	Tier-nr.	Inokulat (Stamm)	Anzahl positiver Schnitte/ Gesamtzahl der Schnitte	Keimzahl [KbE/g Darmgewebe]
Peyer-Platten des <i>Ileums</i>	13	86-24 Nal	1/1	$1,04 \times 10^7$
Ileozäkalklappe	4	86-24 Nal	1/6	$8,10 \times 10^3$
	12	86-24 Nal	1/4	$4,10 \times 10^7$
	13	86-24 Nal	1/4	$1,03 \times 10^7$
<i>rectoanal junction</i>	5	86-24 Nal	1/6	$1,03 \times 10^6$
	6	86-24 Nal	2/9	$6,30 \times 10^5$
	13	86-24 Nal	4/10	$2,80 \times 10^7$
	14	LB226692	4/5	$3,20 \times 10^4$

Makroskopische Veränderungen der Lymphknoten gingen in keinem Fall mit einem bakteriologischen Nachweis der Inokulationsstämme einher. Teilweise spiegelten sich die makroskopischen Veränderungen jedoch auch in der histologischen Untersuchung wider.

Bei einem Tier (Kalb 14) mit positivem immunhistologischem Nachweis spezifisch markierter Erreger des Stammes LB226692 im Tonsillargewebe, konnte der Stamm LB226692 auch bakteriologisch nachgewiesen werden. Bei einem weiteren Tier mit bakteriologischen Nachweis (Kalb 13) des Stammes 86-24 Nal in der Tonsille, gelang jedoch kein immunhistologischer Nachweis des Erregers. Bei 4 exemplarisch bakteriologisch untersuchten Gewebeproben von Tieren mit makroskopischen und histologischen Veränderungen der Lunge konnte entweder *Pasteurella multocida* in Reinkultur oder in Mischkultur mit saprophytären Keimen und teilweise *Staphylococcus simulans* festgestellt werden. Histologisch sichtbare Veränderungen des Pansens wie intrakorneale Mikroabszesse und Para- bzw. Hyperkeratose des Epithels traten bei 6 Tieren auf (Kalb 6 – 9, 12, 13), bei 3 Tieren (Kalb 7 – 9) erfolgte gleichzeitig der bakteriologische Nachweis des entsprechenden Inokulationsstammes im Pansen.

**Tab. 19:** Nachweis makroskopischer Veränderungen, spezifisch markierter adhärenter Bakterien in der Immunhistologie und positiver bakteriologischer Befunde in einzelnen Darmabschnitten

	Nummer der Versuchstiere nach Inokulationsgruppe												
	Stamm 123				Stamm 86-24				Stamm LB226692				
	Makro	IH	Bakteriologie	Makro	IH	Bakteriologie	Makro	IH	Makro	IH	Bakteriologie	Makro	IH
<i>Duodenum</i>	-	x	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	14
<i>Jejunum</i>	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8, 15
JPP	1	x	10	13	(5)	12	8, 14, 15	(7), (15)	8, 14, 15	(7), (15)	14, 15	14, 15	14, 15
IPP	1	x	10	13	(5)	4, 5, 13	8, 14, 15	(14)	8, 14, 15	(14)	14, 15	14, 15	14, 15
Ileozäkalklappe	-	x	10, 11	-	4;12;13	4, 5, 12, 13	14	-	4, 5, 12, 13	-	7, 9, 14, 15	7, 9, 14, 15	7, 9, 14, 15
Zäkum	-	x	10, 11	-	-	4, 5, 12, 13	-	(8)	4, 5, 12, 13	(8)	7, 9, 14, 15	7, 9, 14, 15	7, 9, 14, 15
proximales Kolon	-	x	1*, 10, 11*	-	-	4, 5, 6*, 12, 13	-	-	4, 5, 6*, 12, 13	-	7, 8*, 9, 14, 15	7, 8*, 9, 14, 15	7, 8*, 9, 14, 15
<i>Ansa centralis</i>	-	x	10	-	-	4, 5, 12, 13	-	-	4, 5, 12, 13	-	7, 9, 14, 15	7, 9, 14, 15	7, 9, 14, 15
distales Kolon	-	x	-	-	-	4, 5, 12, 13	-	-	4, 5, 12, 13	-	7, 9, 15	7, 9, 15	7, 9, 15
<i>rectoanal junction</i>	-	x	2*, 3*, 11*	-	5;6;13	4, 5, 6, 12, 13	-	14	4, 5, 6, 12, 13	14	7, 8*, 9*, 14, 15	7, 8*, 9*, 14, 15	7, 8*, 9*, 14, 15
Gallenblase	-	x	-	-	-	-	-	(7), (8), (14)	-	(7), (8), (14)	7*, 8*	7*, 8*	7*, 8*

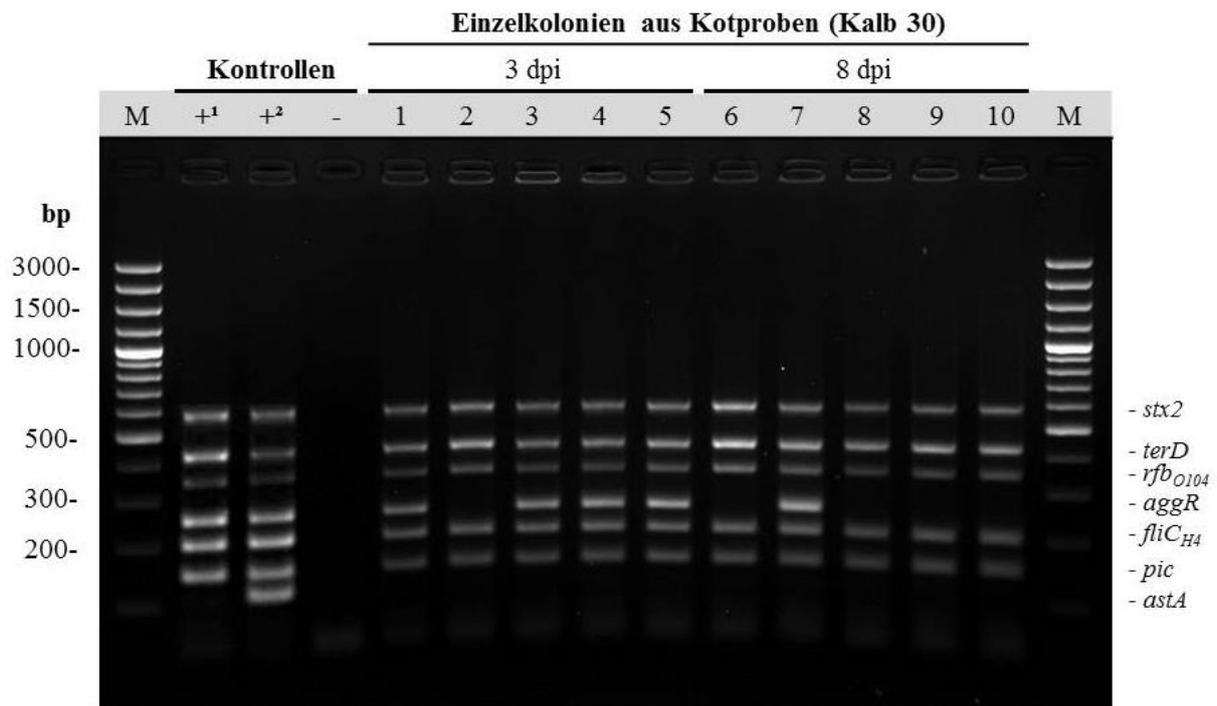
**Erläuterung:** -: kein positiver Befund, x: nicht durchgeführt, (...): fraglicher Nachweis, \* Nachweis nur im Darminhalt, **IH** = Immunhistologie, **IPP** = Peyer-Platten des *Ileums*, **JPP** = Peyer-Platten des *Jejunum*, **Makro** = Makroskopische Veränderungen

## 6.7 Charakterisierung der LB226692-Re-Isolate

Im Rahmen der Verifizierung der aus den Kotproben angezüchteten Re-Isolate des Ausbruchstammes wurden insgesamt 323 via Koloniehybridisierung mit einer *stx2*-Gensonde identifizierte *stx2*-positive Einzelkolonien in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR weiter charakterisiert. Von diesen wurden 300 Einzelkolonien in der Multiplex-PCR als LB226692-Re-Isolate bestätigt, da sie alle vier für die Bestätigung benötigten Charakteristika (*stx2*, *terD*, *rfb<sub>O104</sub>*, *fliC<sub>H4</sub>*) aufwiesen. Außerdem wurden insgesamt 105 in der Koloniehybridisierung als *stx2*-negativ identifizierte Einzelkolonien ebenfalls in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR getestet. Davon wurden 15 Einzelkolonien als *stx2*-positiv erkannt. Auch diese wurden alle mittels drei weiterer Amplifikate als LB226692-Re-Isolate bestätigt. Insgesamt wurden also 315 Einzelkolonien aus 68 verschiedenen Kotproben als LB226692-Re-Isolate identifiziert.

Aus dem Darmgewebe und –inhalt konnten via Koloniehybridisierung 214 *stx2*-positive Einzelkolonien identifiziert werden, welche in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR weiter charakterisiert wurden. Von diesen wurden 181 Einzelkolonien in der Multiplex-PCR als LB226692-Re-Isolate bestätigt, da sie alle vier für die Bestätigung benötigten Charakteristika (*stx2*, *terD*, *rfb<sub>O104</sub>*, *fliC<sub>H4</sub>*) aufwiesen. Weitere 8 mittels Koloniehybridisierung eigentlich als *stx2*-negativ identifizierte Einzelkolonien wurden in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR als LB226692-Re-Isolate bestätigt. Somit wurden 189 Einzelkolonien aus den verschiedenen Darmabschnitten als LB226692-Re-Isolate identifiziert.

Neben den charakteristischen Amplifikaten (*stx2*, *terD*, *rfb<sub>O104</sub>*, *fliC<sub>H4</sub>*) konnte bei 6 LB226692-Re-Isolaten aus Kotproben, sowie 4 aus Darmproben ein zusätzliches Amplifikat für *astA* detektiert werden. Dabei stammten 3 der aus Kotproben isolierten *astA*-positiven Re-Isolate, sowie alle *astA*-positiven Re-Isolate aus Darmproben von einem Tier (Kalb 14). Die weiteren 3 *astA*-positiven Re-Isolate stammten aus Kotproben von 3 verschiedenen Tieren (Kalb 8, 9 und 15).



**Abb. 31:** Elektropherogramm einer HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR von *stx2*-positiven Einzelkolonien aus den Kotproben von Kalb 30 (TV2) vom 3. bzw. 8. dpi. 2 %iges TBE-Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. **Kontrollen:** +<sup>1</sup>: LB226692, +<sup>2</sup>: HUSEC041, -: unbeimpftes Medium, **M:** Größenstandard GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, **bp** = Basenpaare

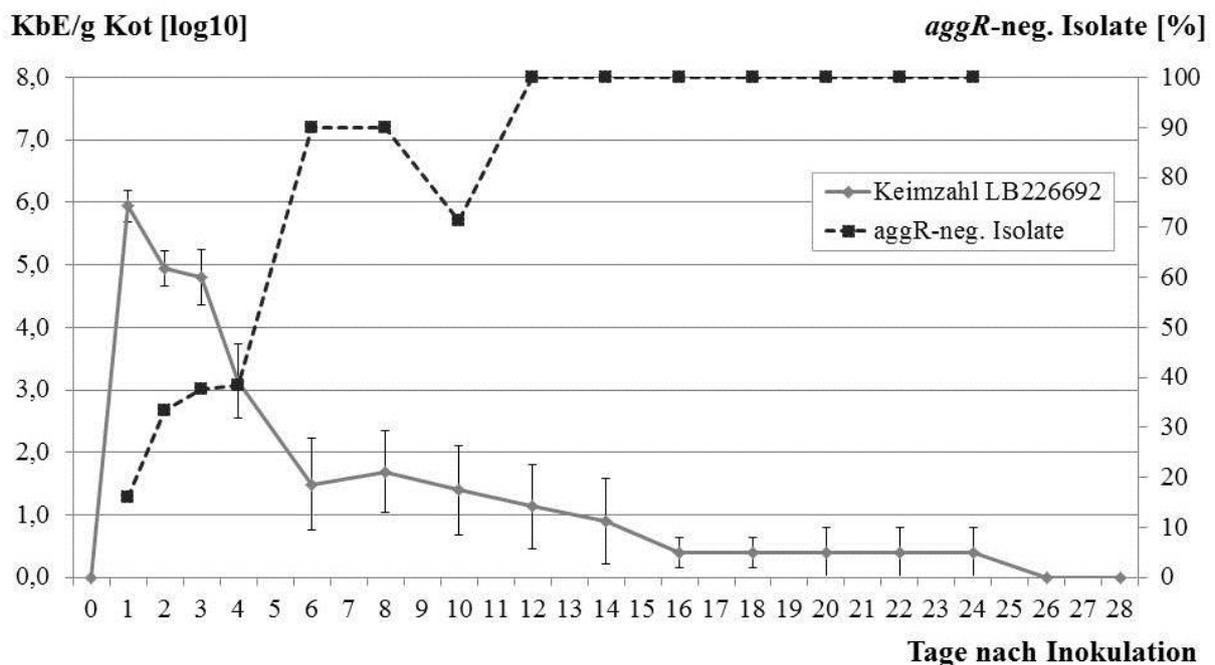
### 6.7.1 Stabilität und Vorkommen des pAA-Plasmids

Von den 315 oben genannten LB226692-Re-Isolaten aus Kotproben besaßen 199 Isolate das *aggR*-Gen, 116 wiesen jedoch kein *aggR*-Gen auf (Abb. 31; Tab. 20). Über die Versuchsdauer nahm der prozentuale Anteil *aggR*-negativer Einzelkolonien kontinuierlich zu (Abb. 32). Von den 189 oben genannten LB226692-Re-Isolaten aus Darmproben besaßen nur 143 Isolate das *aggR*-Gen, 46 Isolate fehlte das *aggR*-Gen. Bezüglich ihrer Morphologie auf BRILLIANCE ESBL Agar (Tab. 8, Seite 11) unterschieden sich die *aggR*-negativen jedoch nicht von den *aggR*-positiven Kolonien.

**Tab. 20:** Charakterisierung der LB226692-Re-Isolate hinsichtlich des pAA-Plasmides

Probenart	Versuch	Anzahl der LB226692-Re-Isolate		
		insgesamt	<i>aggR</i> -positive Isolate	<i>aggR</i> -negative Isolate
Kotproben	TV1	152	111 (73 %)	41 (27 %)
	TV2	163	88 (54 %)	75 (46 %)
	<b>gesamt</b>	<b>315</b>	<b>199 (63 %)</b>	<b>116 (37 %)</b>
Darmproben	TV1	189	143 (76 %)	46 (24 %)

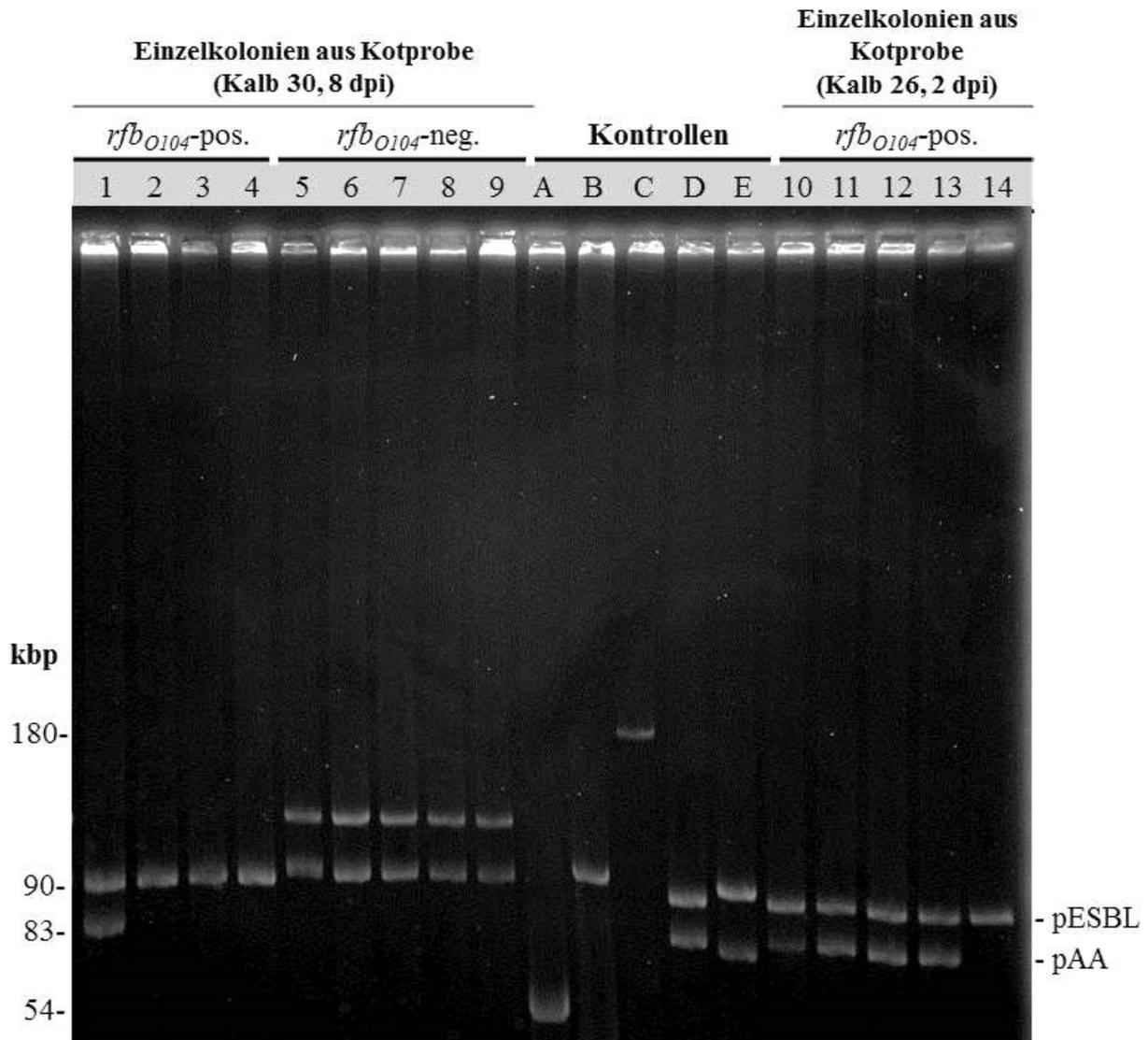
**Erläuterung:** TV = Teilversuch



**Abb. 32:** Anteil der aus dem Kot isolierten *aggR*-negativen LB226692-Re-Isolate an der Keimzahl des Inokulationsstammes bei mit LB226692 inokulierten Tieren (KbE/g Kot aus TV1 und TV2 zusammengefasst)

Von 37 repräsentativ ausgewählten, in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR *aggR*-positiven Isolaten aus Kotproben wurde eine Plasmid-Präparation durchgeführt, wobei bei allen Isolaten ein dem pAA-Plasmid im Molekulargewicht entsprechendes Plasmid (ca. 83 kbp) nachgewiesen werden konnte (Abb. 33, Probe 1 und 10 – 13). Bei 20 repräsentativen, in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR *aggR*-negativen Isolaten konnte auch in der Plasmid-Präparation kein entsprechendes Plasmid nachgewiesen werden (Abb. 33, Probe 2 – 4 und

14). Die Ergebnisse der Multiplex-PCR konnten damit bei allen 57 getesteten Einzelkolonien durch die Ergebnisse der Plasmid-Präparation bestätigt werden.



**Abb. 33:** Elektropherogramm einer Präparation von Plasmid-DNS von *rfb*<sub>O104</sub>-positiven und *rfb*<sub>O104</sub>-negativen Einzelkolonien aus der Kotprobe 8 dpi von Kalb 30 (TV2) und *rfb*<sub>O104</sub>-positiven Einzelkolonien aus der Kotprobe 2 dpi von Kalb 26 (TV2). 0,5 %iges TAE-Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung,

**Kontrollen:** A: *E. coli* V517, B: *Salmonella* Stm Standard, C: *E. coli* R27, D: LB226692; E: HUSEC041, **kbp** = Kilo-Basenpaare

### 6.7.2 Stabilität und Vorkommen des ESBL-Plasmids

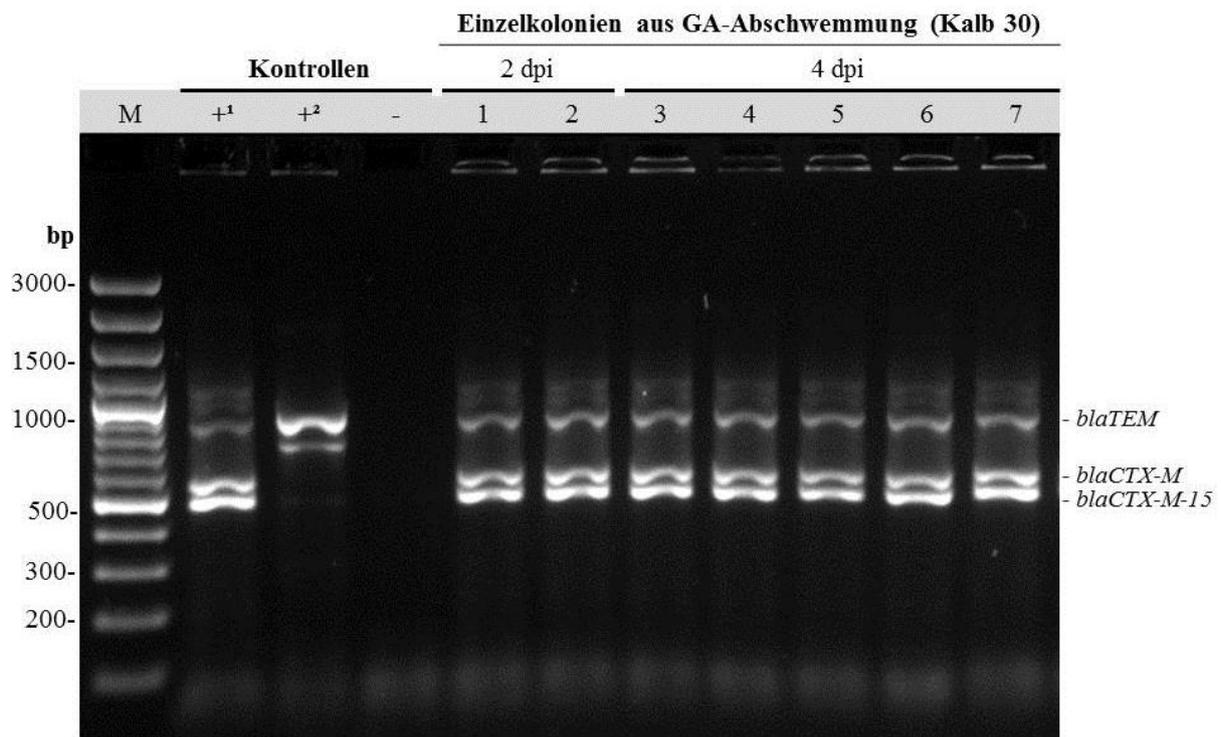
Zur Identifizierung von ESBL-negativen Einzelkolonien wurden aus 16 Gassner-Abschwemmungen von 16 verschiedenen Kotproben aus TV2 Verdünnungsreihen angelegt und diese ausplattiert. Durch die sich anschließende Koloniehybridisierung mit einer Gensonde für das *rfb<sub>O104</sub>*-Gen wurden insgesamt 152 *rfb<sub>O104</sub>*-positive Einzelkolonien identifiziert und diese in der HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR weiter charakterisiert. Von diesen wurden 122 Einzelkolonien in der Multiplex-PCR als *stx2*-, *terD*-, *rfb<sub>O104</sub>*-, und *fliC<sub>H4</sub>*-positiv bestätigt. Mit allen 122 Kolonien konnten in der ESBL-Multiplex-PCR Amplifikate für *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* und *bla<sub>CTX-M-15</sub>* generiert werden (Tab. 21, Abb. 34). Bei 32 von 32 untersuchten Kolonien konnten diese Ergebnisse durch den Nachweis eines entsprechend großen Plasmides bekräftigt werden.

Vergleichend zu den *rfb<sub>O104</sub>*-positiven Isolaten wurden auch *rfb<sub>O104</sub>*-negative Isolate mit entsprechendem Wachstum auf BRILLIANCE ESBL Agar genotypisch untersucht. Dafür wurden weitere 13 *rfb<sub>O104</sub>*-positive und 12 *rfb<sub>O104</sub>*-negative Einzelkolonien, welche über ESBL Agar aus den Kotproben isoliert wurden, zunächst mit der ESBL-Multiplex-PCR getestet. Mit allen *rfb<sub>O104</sub>*-positiven Kolonien konnten Amplifikate für *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* und *bla<sub>CTX-M-15</sub>* erzeugt werden. Die *rfb<sub>O104</sub>*-negativen Kolonien generierten in allen Fällen die Amplifikate für *bla<sub>CTX-M</sub>* und *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* konnte jedoch nur bei 3 Isolaten nachgewiesen werden. Alle 13 *rfb<sub>O104</sub>*-positiven Kolonien enthielten ein im Molekulargewicht dem pESBL des *E. coli*-Stammes LB226692 entsprechendes Plasmid (ca. 90 kbp; Abb. 33, Probe 1 – 4 und 10 - 14). Die 12 *rfb<sub>O104</sub>*-negativen Kolonien enthielten jeweils ein in der Größe zum pESBL nur geringgradig abweichendes Plasmid (> 90 kbp) sowie ein weiteres deutlich größeres Plasmid (ca. 140 kbp; Abb. 33, Probe 5 - 9).

**Tab. 21:** Gesamtzahl der in der ESBL-Multiplex-PCR- und Plasmid-DNS-Präparation untersuchten LB226692-Re-Isolate

Re-Isolate	Anzahl positiver Re-Isolate in der ESBL-Multiplex-PCR				Anzahl positiver Re-Isolate in der Plasmid-Präparation		
	gesamt	<i>CTX-M</i>	<i>CTX-M-15</i>	<i>TEM</i>	gesamt	pAA*	pESBL*
<i>rfb<sub>O104</sub></i> -pos. <sup>#</sup>							
Gassner-Abschwemmung	122	122	122	122	32	28	32
ESBL Agar	13	13	13	13	13	9	13
<b>gesamt</b>	<b>135</b>	<b>135</b>	<b>135</b>	<b>135</b>	<b>45</b>	<b>37</b>	<b>45</b>
<i>rfb<sub>O104</sub></i> -neg. <sup>#</sup>	12	12	12	3	12	0	0

**Erläuterung:** <sup>#</sup> Identifizierung anhand HUSEC041/EAEC-Multiplex-PCR, \* Identifizierung anhand Molekulargewicht



**Abb. 34:** Elektropherogramm einer ESBL-Multiplex-PCR von *rfb<sub>O104</sub>*-positiven Einzelkolonien aus der Gassner (GA)-Abschwemmung von Kalb 30 (TV2) vom 2. bzw. 4. dpi. 2 %iges TBE-Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung,  
**Kontrollen:** +<sup>1</sup>: LB226692; +<sup>2</sup>: HUSEC041; -: unbeimpftes Medium,  
**M:** Größenstandard GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; **bp** = Basenpaare

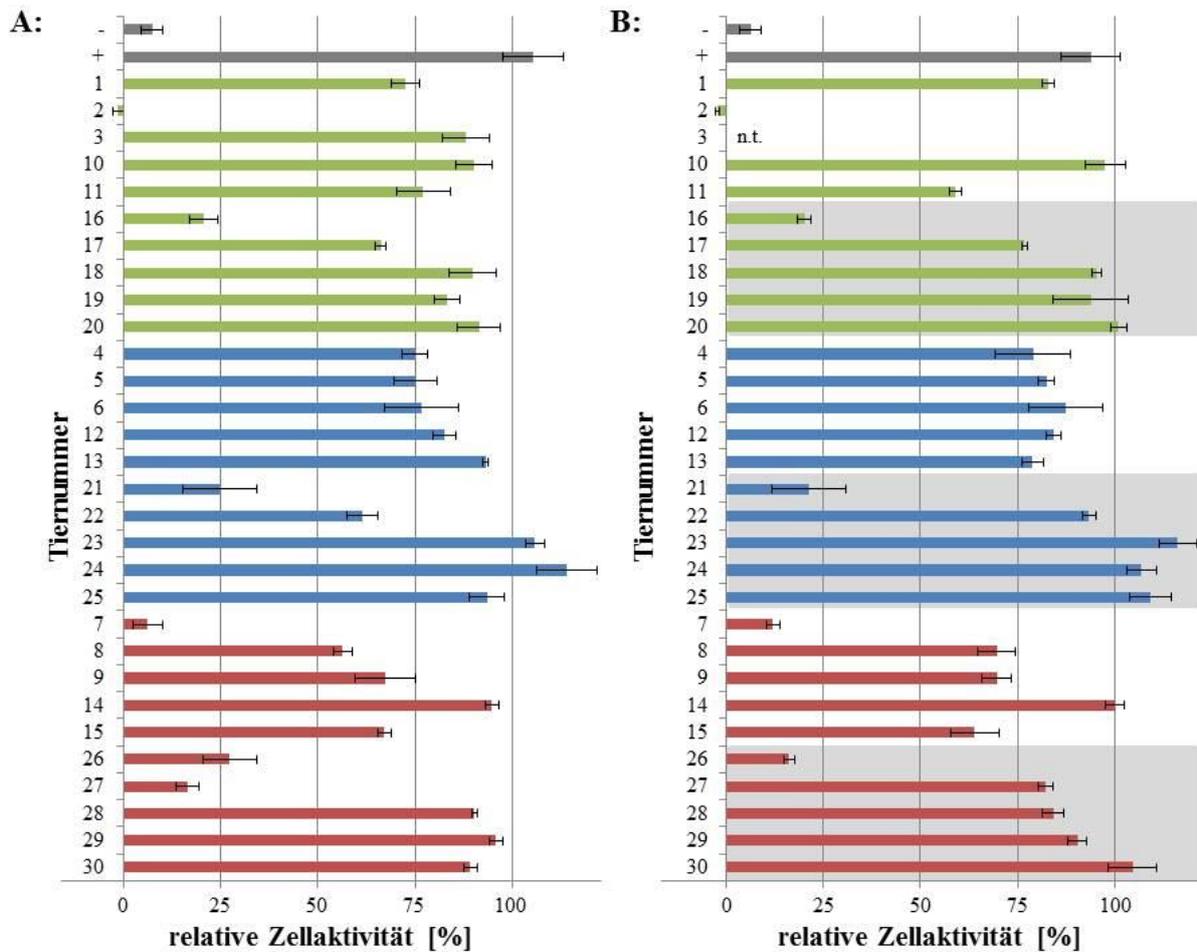
## 6.8 Nachweis Stx-neutralisierender Antikörper

Die Kälber der vorliegenden Studie wurden auf das Vorkommen Stx-spezifischer Antikörper am Tag 0 vor der Inokulation und am letzten Tag des Versuches (TV1: 4 dpi bzw. TV2: 28 dpi) untersucht.

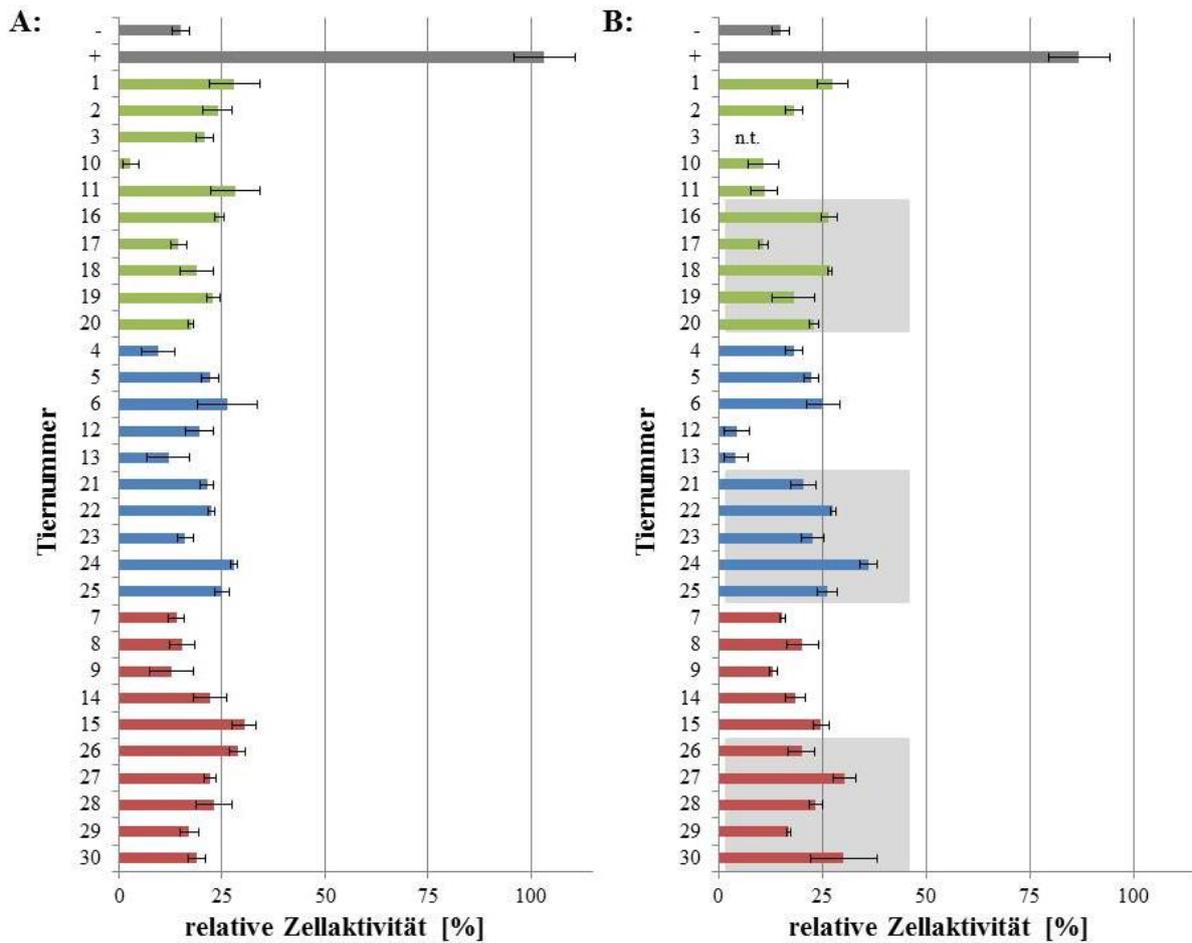
In 24 von 30 untersuchten Serumproben konnten mittels Vero-NT Stx1-Ak am Tag 0 nachgewiesen werden (Abb. 35). Bei zwei Tieren ohne neutralisierende Stx1-Ak aus TV1 (Kalb 2 und 7) und bei 3 der 4 Tiere ohne neutralisierende Stx1-Ak aus TV2 (Kalb 16, 21, 26 und 27) konnten auch 4 dpi bzw. 28 dpi keine Antikörper detektiert werden. Ein Tier (Kalb 27) aus TV2 entwickelte während des Versuches neutralisierende Antikörper gegen Stx1. Somit konnten am letzten Tag der Versuche bei 25 Tieren neutralisierende Stx1-Ak nachgewiesen werden.

In keiner der 60 Serumproben von Tag 0 vor der Inokulation und vom letzten Tag des Versuches (TV1: 4 dpi, TV2: 28 dpi) konnten Stx2-spezifische neutralisierende Antikörper (Stx2-Ak) nachgewiesen werden (Abb. 36).

Die Probe von Kalb 3 4 dpi zeigte im VeroNT sowohl im toxinhaltigen wie auch im toxfreien Dreifachansatz ein stark verringertes Wachstum der Zellen ähnlich dem der Positivkontrolle.



**Abb. 35:** **Stx1-spezifische Antikörper im Vero-NT** **A:** zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (0 dpi), **B:** zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme (4 dpi (Tier 1 – 15) und 28 dpi (grau hinterlegt; Tier 16 - 30)). **grün:** Tiere inokuliert mit Stamm 123, **blau:** mit Stamm 86-24 Nal, **rot:** mit Stamm LB226692, -: Antiserum mit definiert negativem Antikörperstatus (13IC0006), +: Antiserum mit definiert positivem Antikörperstatus (12E0097), **n.t.** = nicht testbar



**Abb. 36:** **Stx2-spezifische Antikörper im Vero-NT** **A:** zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme (0 dpi), **B:** zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme (4 dpi (Tier 1 – 15) und 28 dpi (grau hinterlegt; Tier 16 - 30)). **grün:** Tiere inokuliert mit Stamm 123, **blau:** mit Stamm 86-24 Nal, **rot:** mit Stamm LB226692, -: Antiserum mit definiert negativem Antikörperstatus (13IC0006), +: Antiserum mit definiert positivem Antikörperstatus (12E0097), **n.t.** = nicht testbar

## 7 Diskussion

Die genetischen und phänotypischen Eigenschaften des humanpathogenen und besonders virulenten STEC/EAEC-Stammes des Serotyps O104:H4 stellten 2011 das vorherige Verständnis der Infektionsbiologie von STEC/EHEC in Frage. Während Rinder das Hauptreservoir für typische STEC darstellen [12, 195, 321] konnten EAEC-Stämme bislang nicht in der Rinderpopulation nachgewiesen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass der Ausbruchsstamm, dessen eigentliche Herkunft jenseits der Kontamination von Sprossen für den menschlichen Verzehr noch nicht bestimmt werden konnte, in Nutztierpopulationen eingetragen wird. Für eine Risikobewertung im Hinblick auf die zukünftige Sicherheit von Lebensmitteln ergab sich die Frage, ob der Stamm in der Lage ist, dauerhaft eine biologische Nische im Nutztier, z.B. den Darm von Wiederkäuern, zu kolonisieren.

### 7.1 Infektionsmodell

Für die Untersuchungen wurde ein Infektionsmodell am FLI implementiert, wobei auf ein gut dokumentiertes Modell von Kooperationspartnern [73] zurückgegriffen wurde. In einem ersten Teilversuch (TV1), durchgeführt in zwei unabhängigen Durchgängen, wurde über eine Versuchsdauer von 4 Tagen die Quantität und der Verlauf der fäkalen Ausscheidung untersucht. Die kurze Versuchsdauer ermöglichte die Betrachtung von Wirt-Erreger-Interaktionen in der Phase der Infektion, in der eine hohe Erregerzahl fäkal ausgeschieden wird und mit großer Wahrscheinlichkeit Bakterienzellen des positiven Kontrollstammes 86-24 Nal adhärierend an die Mukosa nachgewiesen werden können. Eine enge Adhäsion der STEC an die Mukosa ist essentiell für eine Persistenz der Stämme im bovinen Intestinum [63, 272, 284, 305]. Nach erfolgreichem Nachweis des Ausbruchsstammes im ersten Teilversuch wurden im TV2 die Dauer der Ausscheidung und die Entwicklung einer Immunantwort über einen Zeitraum von 28 Tagen dokumentiert.

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um ca. 100 Tage alte, konventionell aufgezogene Kälber. Sie wurden noch im Herkunftsbetrieb auf eine raufaserreiche Fütterung umgestellt und wiesen altersgerecht entwickelte Vormägen auf. Abgesetzte Kälber scheiden STEC meist in höheren Raten als adulte Rinder aus [60, 90, 92, 268, 330] und stellen somit ein hohes Gefahrenpotential für die Verbreitung von STEC in der Rinderpopulation dar. Da Kälber dieses Alters unter konventionellen Haltungsbedingungen freilaufend in Gruppen gehalten werden, wurde diese Art der Aufstallung auch für diesen Versuch gewählt.

Vor Versuchsbeginn wurde sichergestellt, dass die Kälber nicht bereits große Mengen resistenter coliformer Keime mit dem Kot ausschieden, die die spätere Quantifizierung der

Inokulationsstämmen auf Selektivnährböden mit Antibiotikumzusatz erschwert hätten. Für die Quantifizierung wurden verschiedene Medien mit unterschiedlichem Antibiotikumgehalt getestet. Es wurden schließlich Medien ausgewählt, die trotz möglichst hoher Selektivität das Wachstum der Stämme nicht beeinträchtigten. Bei der Voruntersuchung war zu beobachten, dass die Menge an resistenten coliformen Keimen mit der Dauer der ungekühlten Lagerung der Kotprobe bis zur weiteren Bearbeitung, z.B. im Herkunftsbetrieb der Tiere oder während des Transportes, zunahm. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass *E. coli* sich in einer frischen Kotprobe bei ungekühlter Lagerung über einen sehr langen Zeitraum vermehren können [199, 277]. Da es nicht gelang eine ausreichende Anzahl an Kälbern zu identifizieren, die keine coliformen Keime mit der gleichen Resistenz wie die Inokulationsstämmen ausschieden, wurden die Kälber zumindest so in die entsprechende Inokulationsgruppe eingeteilt, dass sie zu jedem Zeitpunkt der Vortestung nur sehr wenige Keime mit Wachstum auf dem entsprechenden Selektivnährmedium aufwiesen. Die dann während der Versuche gewonnenen Kotproben wurden für die Quantifizierung der Ausscheidung noch am Tag der Probenentnahme weiterverarbeitet.

Die Inokulation erfolgte wie in mehreren Studien beschrieben intraruminal [72-74]. Vor der Inokulation wurde den Kälbern für 48 h das Futter entzogen, um die Empfindlichkeit gegenüber den Inokulationsstämmen bzw. deren Ausscheidungsrate zu erhöhen [72, 244]. Die Kälber wurden mit einer Dosis von  $10^{10}$  KbE inokuliert. Mit dieser Keimzahl ist bei klassischen STEC eine Kolonisation aller Versuchstiere erreichbar [66, 74, 118, 271].

Eine Versuchsgruppe wurde als Negativkontrolle mit dem Stamm 123 inokuliert. Dieser aus Schweinen isolierte *E. coli*-Stamm weist keine bekannten Virulenzfaktoren auf und wurde bereits in mehreren Infektionsversuchen mit Kälbern auf sein Ausscheidungsverhalten untersucht [74, 75, 118]. Die Ausscheidungskurven geben keinen Hinweis auf eine Kolonisation und Proliferation dieses kommensalen Stammes im Rinderdarm. Auf den Einsatz eines EAEC-Stammes ohne Stx-Bildungsvermögen als Negativkontrolle wurde verzichtet, da bisher noch zu wenig zum Kolonisationsverhalten von EAEC im Rinderdarm bekannt ist. Als Positivkontrolle wurde der Stamm 86-24 Nal eingesetzt, dessen Kolonisationsverhalten im verwendeten Modell bereits intensiv erforscht wurde [74, 118, 253]. Höhe und Dauer der Ausscheidung von Stamm 123 und Stamm 86-24 Nal in unseren Versuchen waren mit den Ergebnissen vorangegangener Versuche [74, 118] vergleichbar. Während Kälber, inokuliert mit Stamm 123, im Mittel einen stetigen Abfall in der Ausscheidung zeigten, zeigten Kälber, die mit Stamm 86-24 Nal inokuliert wurden, eine intermittierende Ausscheidung. Dies konnte auch in Feldstudien oder anderen Infektions-

versuchen immer wieder nachgewiesen werden und wurde auf einen zwischenzeitlichen Abfall der Keimzahl unter die Nachweisgrenze, eine tatsächliche intermittierende Ausscheidung oder eine ständige Reinfektion durch den Kontakt zu anderen Tieren zurückgeführt [97, 140]. Die Kälber zeigten unabhängig vom Inokulationsstamm eine hohe Variation innerhalb der Inokulationsgruppe in der Höhe und Dauer der fäkalen Ausscheidung. Es wird vermutet, dass eine unterschiedliche Empfänglichkeit einzelner Tiere dazu führt, dass neben Tieren, die STEC nur über kurze Zeit oder in geringen Mengen ausscheiden, auch sogenannte „*supershedder*“ auftreten, die den Erreger meist intermittierend über einen sehr langen Zeitraum ausscheiden [45, 66, 74, 214].

Der Stamm 86-24 Nal löste bei allen Tieren das beschriebene histologische Bild der A/E-Läsionen aus [74, 285]. Als bevorzugte Kolonisationsorte konnten auch in unseren Versuchen die *rectoanal junction* (RAJ) und die Ileozäkalklappe (ICE) [72, 74, 214, 216] identifiziert werden. Die Enterozyten der Rektumschleimhaut waren häufiger besiedelt als das verhornende Plattenepithel des Analkanals. An den Adhäsionsstellen waren meist Mikrokolonien des Stammes 86-24 Nal zu finden. Ein Nachweis positiv markierter adhärerender Bakterien gelang ab einer Keimzahl von  $8,10 \times 10^3$  KBE/g Darmgewebe. Durch Auswahl der Kontrollstämme war es möglich den Stamm LB226692 mit einem nicht kolonisierenden, kommensalen *E. coli* (Stamm 123) und einem gut an das Rind adaptierten, klassischen STEC (Stamm 86-24 Nal) zu vergleichen und somit Rückschlüsse auf sein Kolonisationsverhalten zu ziehen.

Krankheitserscheinungen durch STEC-Infektionen wie Durchfall sind beim Rind selten und treten auch bei experimentellen Infektionen nur in wenigen Fällen und vor allem bei sehr jungen oder immunsupprimierten Kälbern auf [75, 107, 201, 264, 283]. Bei dem neuartigen Stamm LB226692, für den bisher nur ein humanes Reservoir nachgewiesen wurde [151], war ein schwerwiegender Krankheitsverlauf unwahrscheinlich, da bisher weder inapparente noch klinisch manifeste Infektionen von Rindern mit typischen EAEC bekannt sind [53, 321]. Einige Kälber entwickelten zwar nach der Inokulation oder sporadisch im Versuchsverlauf Durchfall. Dieser trat aber in allen Inokulationsgruppen einschließlich der Negativkontrolle auf. Bei den Tieren, welche mit Stamm 123 oder dem Ausbruchstamm LB226692 inokuliert wurden, konnte keine Korrelation zwischen der jeweils ausgeschiedenen Keimzahl und der Kotkonsistenz festgestellt werden. Der Durchfall könnte auf die Endotoxinabsorption nach der massiven Gabe von gramnegativen Bakterien zurückzuführen sein [45], aber auch ein Zusammenhang mit dem 48 h dauernden Futterentzug ist nicht auszuschließen. Häufig kommt es bei augenscheinlich gesunden Kälbern dieses Alters auch zu spontaner transientser Diarrhoe

[66]. Somit hat der Ausbruchstamm keine Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden gesunder Kälber. Die schwache Korrelation zwischen der ausgeschiedenen Keimzahl von Stamm 86-24 Nal und der Kotkonsistenz könnte auf eine Beteiligung dieser klassischen STEC am Durchfallgeschehen hindeuten.

In der parasitologischen Voruntersuchung konnte bei den Kälbern ein Nematoden- und Kokzidienbefall nachgewiesen werden. Die Kombination eines bestehenden Parasitenbefalls mit der Inokulation von Bakterien könnte sich begünstigend auf die Entwicklung von Symptomen wie z.B. Durchfall ausgewirkt haben [72]. Als weiteren Nebenfund zeigten alle Kälber mindestens an einem Untersuchungszeitpunkt Husten und/oder Nasenausfluss, einzelne Tiere sogar über den kompletten Versuchszeitraum. Bei der Sektion und histologischen Untersuchung konnten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch hochgradige Veränderungen an der Lunge festgestellt werden, die dem Bild einer enzootischen Bronchopneumonie entsprachen. Dieser Befund wurde bei ausgewählten Kälbern auch bakteriologisch bestätigt. Mit fortschreitender Infektion kam es bei einigen Kälbern zur Einbeziehung der umliegenden Strukturen und Ausbildung einer fibrinösen Pleuritis und Nischenperikarditis. Es handelte sich größtenteils um chronische Veränderungen mit fortschreitender Abheilung und nicht um ein paralleles akutes Infektionsgeschehen. Auswirkungen dieser Koinfektionen auf das Versuchsgeschehen können nicht ausgeschlossen werden, entsprechen jedoch den Bedingungen einer konventionellen Tierhaltung. Das Auftreten dieser Veränderungen bei allen Versuchsgruppen erlaubte trotzdem einen Vergleich der Infektionsdynamiken zwischen den Inokulationsstämmen.

## 7.2 Ergebnisse der experimentellen Infektion

Entscheidend für die Frage, ob der Stamm LB226692 tatsächlich im Rind kolonisieren kann, ist die Definition des Begriffes Kolonisation. Dieser wird bei verschiedenen Autoren sehr unterschiedlich verwendet. So ist bei einigen Autoren eine höhere fäkale Ausscheidung des entsprechenden Stammes verglichen mit einem kommensalen *E. coli* das ausschlaggebende Kriterium [72, 305]. Auch wird bei der Ausscheidung von Keimzahlen, die auf eine Proliferation des Inokulationsstammes schließen lassen, von einer möglichen Kolonisation gesprochen [73, 140]. In unseren Versuchen gelang es nicht nur, die Kälber in mehreren Teilversuchen erfolgreich mit dem *E. coli*-Stamm LB226692 zu infizieren, er war im Mittel auch in höheren Keimzahlen als der kommensale *E. coli*-Stamm 123 nachweisbar. Zu Beginn des Versuchszeitraumes konnten ähnliche Keimzahlen wie bei Stamm 86-24 Nal nachgewiesen

werden, doch mit andauernder Infektion zeigte sich ein stetiger Abfall der Keimzahlen und somit eine geringere Ausscheidung als bei dem klassischen STEC-Stamm. Neben der Höhe ist die Dauer der Ausscheidung ein weiteres wichtiges Kriterium, wobei je nach Autor eine Ausscheidung von wenigen Tagen [74, 305] bis mehreren Wochen [140, 271] als Indiz für eine Kolonisation angesehen wird. Als Ansatzpunkt, ob es sich um eine reine Passage des Inokulums oder eine Proliferation des Erregers im Intestinum handelt, kann auf die experimentell ermittelte Magen-Darm-Passagezeit unterschiedlicher sich nicht vermehrender Partikel bei laktierenden Kühen von bis zu 60 h [5, 123] zurückgegriffen werden. Jedoch kann nach Meinung einiger Autoren auch bei einer Ausscheidungszeit von mehreren Tagen bis zu einer Woche nicht sicher ausgeschlossen werden, dass es sich nicht nur um Replikat aus dem Darmlumen handelt, die nicht auf eine stabile Assoziation zwischen der Mukosa und dem Bakterium zurückzuführen sind [271]. Der Stamm LB226692 wurde von allen Kälbern über einen Zeitraum von mindestens 3 Tagen im Kot ausgeschieden. Er konnte im TV2 über einen weitaus längeren Zeitraum als der Stamm 123 detektiert werden. Die Kälber zeigten, wie auch die Kälber inokuliert mit Stamm 123 und Stamm 86-24 Nal, eine hohe Variation innerhalb der Inokulationsgruppe in der Dauer der fäkalen Ausscheidung. Bei einem Tier gelang der Nachweis des Stammes LB226692 bis ins letzte Drittel des TV2. Folgt man den in der Literatur aufgeführten Kriterien, lässt sowohl die Höhe als auch die Dauer der Ausscheidung auf eine Kolonisation des Stammes LB226692 im bovinen Intestinum schließen.

Diese Schlussfolgerung wird durch bakteriologische und histologische Befunde am Darmgewebe unterstützt. In einigen Studien wird für die Definition des Begriffes Kolonisation auch das Vorhandensein einer bestimmten Keimmenge am Darmgewebe zum Zeitpunkt der Sektion herangezogen [73, 74]. Auch in unseren Versuchen konnte der kulturell-bakteriologische Nachweis des Stammes LB226692 in entsprechender Zahl an verschiedenen Darmlokalisationen 4 dpi erbracht werden. Bakterien konnten vor allem in den Gewebeproben am Übergang zum und im Dickdarm nachgewiesen werden. Während der Stamm im Dünndarm nur vereinzelt detektierbar war, war er im Dickdarm bei der gleichen Anzahl an Tieren und in einer ähnlichen Keimzahl wie der Stamm 86-24 Nal nachweisbar. Auch war der Ausbruchstamm bei mehr Tieren und in höheren Zahlen als der Stamm 123 nachweisbar. Dies spricht dafür, dass der Ausbruchstamm besser als der kommensale Stamm 123 an den einzelnen Darmlokalisationen haften kann. Wie für klassische STEC [49, 102] scheint der Dickdarm inklusive der RAJ auch die bevorzugte Darmlokalisation für den Stamm LB226692 zu sein. Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen war der Ausbruchstamm an keiner der untersuchten

Darmlokalisationen mehr kulturell-bakteriologisch nachweisbar. Einzig der Stamm 86-24 Nal konnte zu diesem Zeitpunkt an einigen Darmlokalisationen nachgewiesen werden.

Als weiteres Merkmal einer erfolgreichen Kolonisation der Darmschleimhaut werden die für die meisten STEC typischen A/E-Läsionen aufgeführt [45, 73, 74], da eine enge Adhäsion der STEC an die Mukosa essentiell für eine Persistenz der Stämme im bovinen Intestinum ist [63, 272, 284, 305]. Auch der Ausbruchstamm ist mit Adhärenzfaktoren ausgestattet, die eine enge Anheftung an Darmepithelzellen in Form einer aggregativen Adhärenz erlauben [28, 299]. Der Nachweis adhätierender Bakterien gestaltete sich in unseren Untersuchungen insgesamt schwierig. Auch in anderen Studien war ein Nachweis von durch STEC verursachten A/E-Läsionen nicht immer möglich. Dies wurde entweder auf eine zu niedrige Keimzahl an der entsprechenden Lokalisation ( $< 10^6$  KbE/g Gewebe) [66, 72] oder auf einen zu späten Sektionszeitpunkt (13 - 32 dpi) [45, 111, 331] zurückgeführt. In der histologischen Untersuchung konnten an das Darmepithel adhätierende Erreger des Stammes LB226692 4 dpi bei einem der 5 inokulierten Kälber gefunden werden. Bei diesem Kalb lösten sich im Analkanal Hornschuppen vom Epithel ab. In diesem Bereich waren zahlreiche positiv markierte Bakterien an den abgelösten Hornschuppen und auch einzelne Erreger an der Epitheloberfläche zu finden. Der Nachweis spezifisch markierter adhätierender Bakterien gelang bei einer Keimzahl des Stammes LB226692 von  $3,20 \times 10^4$  KbE/g Darmgewebe an dieser Lokalisation. Sowohl bei Stamm 86-24 Nal als auch bei Stamm LB226692 ging ein positiver immunhistologischer Nachweis immer mit einem positivem Nachweis des entsprechenden Stammes in der bakteriologischen Untersuchung einher und erfolgte im Mittel bei einer Keimzahl von  $1,14 \times 10^7$  KbE/g Darmgewebe. Ein positiver bakteriologischer Nachweis führte in 23 % (Stamm 86-24 Nal) bzw. 3 % (Stamm LB226692) der Fälle auch zu einem positivem immunhistologischen Nachweis. Es ist davon auszugehen, dass wie bereits von anderen Autoren vermutet [72], ein fehlender Nachweis von adhätierenden Bakterien an einigen Lokalisationen eher auf die stark fokale Verteilung als auf ein generelles Unvermögen des Stammes zur Adhäsion bei der untersuchten Tierspezies zurückzuführen ist.

Die bakteriologischen und histologischen Befunde am Darmgewebe sprechen, ergänzend zu den Ausscheidungskurven, für eine Kolonisation des *E. coli*-Stammes LB226692 im bovinen Intestinum. Dabei deuten jedoch die negativen bakteriologischen Befunde 28 dpi sowie die geringere Nachweisrate von adhätierenden Bakterien auf eine schlechtere Adaption des Stammes an Rinder im Vergleich zu Stamm 86-24 Nal hin.

Auffällig war die bakteriologische Detektion des Stammes LB226692 4 dpi im Pansen- und Labmageninhalt. Auch Stamm 123 und Stamm 86-24 Nal konnten in vergleichbaren Keimzahlen, jedoch bei weniger Einzeltieren im Panseninhalt nachgewiesen werden. Für klassische STEC wurden die Vormägen als primärer Kolonisationsort beschrieben [45, 111, 331], bis dies durch andere Studien widerlegt wurde [49, 102]. Dennoch konnten auch in neueren Studien klassische STEC in niedrigen Keimzahlen bis zu 16 dpi in den Vormägen nachgewiesen werden [49, 102]. Als Erklärung für frei im Panseninhalt vorhandene Bakterien der Inokulationsstämme kommt eine ständige Reinfektion der Tiere durch Tier-zu-Tier-Kontakt oder durch die kontaminierte Stallumgebung in Betracht. Da die Kälber freilaufend in Gruppen gehalten wurden, kann eine Reinfektion einzelner Kälber innerhalb der Versuchsgruppen durch infizierte Kälber der gleichen Gruppe nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der Stamm LB226692 und der Stamm 86-24 Nal tatsächlich die kutane Pansenschleimhaut kolonisieren können. Dies konnte jedoch in früheren Studien für klassische STEC nicht nachgewiesen werden [45]. In der vorliegenden Studie erfolgte keine immunhistologische Untersuchung des Pansenepithels. Möglich ist dennoch, dass der Futterentzug vor der Inokulation oder eine Vorschädigung des Epithels die Ansiedlung des Erregers begünstigten. Bei den 3 mit dem Stamm LB226692 inokulierten Tieren mit positivem bakteriologischem Befund im Panseninhalt konnten histologisch intrakorneale Mikroabszesse sowie Para- bzw. Hyperkeratosen der obersten Hornschicht im Pansen nachgewiesen werden. Schließlich ist auch ein längerer Verbleib dieser Bakterien im Pansen als bisher angenommen nicht unwahrscheinlich, da auch der negative Kontrollstamm 4 dpi noch im Panseninhalt nachweisbar war. In den beiden letztgenannten Szenarien könnte der Pansen die Funktion eines Reservoirs haben und somit als Quelle einer ständigen Reinfektion der nachfolgenden Darmabschnitte dienen. Dies könnte auch den Nachweis des Stammes LB226692 im Labmageninhalt 4 dpi erklären, wo eine erhöhte Säureresistenz des Ausbruchstammes [184] zu einer unbeschädigten Passage des Labmagens geführt haben könnte.

Des Weiteren gelang der bakteriologische Nachweis des Stammes LB226692 aus dem Inhalt der Gallenblase. Bereits für klassische STEC wurde die Gallenblase als mögliche Nische und Lokalisation für eine persistierende Infektion beschrieben [74, 285], der Nachweis gelang jedoch nur bei Dexamethason-behandelten Kälbern. Dies könnte der Grund sein, warum in unseren Versuchen der Stamm 86-24 Nal nicht in der Gallenblase nachgewiesen wurde. Bei den zwei mit Stamm LB226692 inokulierten Tieren mit positivem bakteriologischem Nachweis in der Galle wurden auch in der histologischen Untersuchung markierte Strukturen an der Schleimhaut der Gallenblase entdeckt, die jedoch nicht eindeutig dem Ausbruchstamm

zuzuordnen waren oder deren Interaktionen mit den Epithelzellen nicht zweifelsfrei geklärt werden konnten. Für klassische STEC wurde ein Zusammenhang zwischen der Höhe der fäkalen Ausscheidung und dem Nachweis von adhärenenten Bakterien in der Gallenblase beschrieben [74]. Auch in der vorliegenden Studie waren die histologischen Befunde in der Gallenblase bei zwei Kälbern an einen hohen bakteriellen Nachweis im Inhalt des Rektums geknüpft ( $> 10^7$  KbE/g Probe). Die Gallenblase könnte somit eine weitere Nische für den Stamm LB226692 darstellen und zu einer prolongierten und/oder intermittierenden Ausscheidung des Erregers führen.

Der Stamm LB226692 wurde bei einem Tier bakteriologisch auch in der Tonsille nachgewiesen. Ebenso gelang bei einem Tier, inokuliert mit Stamm 86-24 Nal, der Nachweis aus Tonsillargewebe. Der Nachweis klassischer STEC an dieser Lokalisation war bisher selten [66, 85, 313], allerdings war diese Lokalisation auch selten Gegenstand der Untersuchungen. Es ist unklar, ob es sich hierbei um eine Adhärenz der Bakterien an das Gewebe handelt oder um eine transiente oberflächliche Kontamination durch die Inokulation (bei oraler Gabe), Aufnahme von kontaminiertem Material während des Versuches oder durch den Prozess des Wiederkäuens [66]. Der komplexe Aufbau der bovinen Tonsillen ermöglicht vielen Bakterien die Kolonisation auch ohne eine echte Anheftung an das Epithel [85]. Begünstigend scheinen sich dabei die histologisch festgestellten entzündlichen Veränderungen der Tonsille auszuwirken. Bei dem mit dem Stamm LB226692 inokuliertem Tier mit positivem bakteriologischem Befund konnten auch in der histologischen Untersuchung spezifisch markierte Bakterien im Nekrosebereich einer Tonsillarkrypte (Kryptabszess) nachgewiesen werden. Sie befanden sich dabei in enger Nachbarschaft zu eingeströmten Granulozyten. Die Tonsille könnte also auch eine biologische Nische für den Ausbruchstamm darstellen. Eine ständige Reinfektion des GIT oder die orale Übertragung auf andere Tiere ist nicht auszuschließen.

Wie die Kontrollstämme konnte der Stamm LB226692 weder in Lymphknoten (*Lnn. jejunalis*, *Lnn. cecalis*) noch in der Leber der Tiere nachgewiesen werden. Bei STEC wie auch bei EAEC wurde zwar immer wieder über eine gewisse Invasivität *in vitro* berichtet [19, 222], es gibt jedoch keinerlei Hinweise darauf, dass diese *E. coli*-Pathotypen *in vivo* tatsächlich invasiv sind [115, 182, 209, 210]. Der gelegentliche Nachweis von STEC aus Lymphknoten in anderen Infektionsversuchen wurde von den Autoren auf eine Kontamination bei der Sektion zurückgeführt [313].

Es zeigte sich also, dass der Stamm LB226692 neben der Kolonisation der Darmschleimhaut auch andere Lokalisationen des GIT als biologische Nische nutzen könnte. Ob es sich dabei

um eine tatsächliche Adhärenz an das jeweilige Epithel oder aber um einen transienten Verbleib an der jeweiligen Lokalisation handelt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Auffällig ist die Form der Adhärenz des Ausbruchstammes, die sich vom Stamm 86-24 NaI unterscheidet. Da ihm der klassische Adhäsionsfaktor der STEC – das Intimin – fehlt [28], bildet er keine A/E-Läsionen aus. Dabei weist der Ausbruchstamm jedoch auch nicht die für EAEC typische [206] und in Zellkulturen für den Ausbruchstamm nachgewiesene [28, 299] aggregative Adhärenz (AA) auf. Die adhärierenden Bakterien bildeten in unseren Versuchen keine Kolonien, sondern lagen einzeln. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass das pAA-Plasmid und somit die Ausbildung von AAF/I und Dispersin unter der Regulation von AggR nicht an der Adhärenz im Rinderdarm beteiligt sind. Ähnliche Erkenntnisse lieferte bereits ein Kaninchenmodell wo ein Fehlen des pAA-Plasmides weder auf die Kolonisation des Darmes, noch auf die Entwicklung von Krankheitssymptomen oder von histologischen Veränderungen Auswirkungen hatte [203]. Ob weitere Adhäsionsfaktoren wie das Iha für diese Form der Adhärenz verantwortlich sind, kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Ihnen wird jedoch auch bei humanen Infektionen eine gewisse Beteiligung an der gesteigerten Adhärenz des Ausbruchstammes an das humane Kolonepithel und somit dem besonders schweren Krankheitsverlauf nachgesagt [151]. Des Weiteren wurde das Iha auch bei anderen STEC-Stämmen ohne *eae*-Gen nachgewiesen [184, 291]. Aufgrund der besonderen Form der Adhärenz des Ausbruchstammes, insbesondere der isolierten Lage der Bakterien, konnten markierten Strukturen nicht immer eindeutig dem Stamm LB226692 zugeordnet bzw. eine tatsächliche Adhärenz an die Epithelzellen nicht zweifelsfrei geklärt werden, z.B. an den Peyer-Platten des *Jejunums* (JPP) und des *Ileums* (IPP) sowie an der Zäkum-Schleimhaut. Klassische O157-STECS zeigten im Tiermodell immer wieder eine hohe Affinität zum Lymphfollikel-assoziierten Epithel an der RAJ, während sie in anderen Abschnitten des GALT, wie den Peyer-Platten, nicht nachgewiesen werden konnten [172, 214]. Bei *in vitro*-Versuchen mit humanen Gewebeproben erfolgte die initiale Adhäsion von O157:H7-STECS jedoch ausschließlich an das Follikel-assoziierte Epithel der Peyer-Platten [233], und auch andere bakterielle Erreger präferieren die Peyer-Platten für eine initiale Anheftung [133]. Teilweise handelt es sich dabei um spezifische Bindungen [14, 59, 309]. Bei O157:H7-STECS wird eine spezifische Bindung des  $\gamma$ 1 Intimin an die  $\beta$ 1-Integrine der M-Zellen der Peyer-Platten vermutet [86, 232, 233]. Da der Ausbruchstamm kein Intimin besitzt, könnten andere Adhäsionsfaktoren für die Befunde an den JPP und IPP verantwortlich sein. Allerdings kann auch eine unspezifische Bindung einzelner Bakterien nicht ausgeschlossen werden.

Der Stamm LB226692 war vor allem auf der kutanen Schleimhaut des Rektums zu finden, nicht jedoch im Bereich der Drüschleimhaut. Studien zur Persistenz klassischer O157-STEC an der RAJ konzentrierten sich oft auf die Besiedlung der Enterozyten der Rektumschleimhaut [214]. Aber auch am verhornenden Plattenepithel des Analkanals wurden *in vivo* und *in vitro* adhätierende O157-STEC beschrieben [74, 162, 236]. Während *in vivo*-Untersuchungen A/E-ähnliche Läsionen an der kutanen Schleimhaut aufzeigten [236], konnten *in vitro* unterschiedliche Mechanismen der Adhärenz an die verschiedenen Epitheltypen nachgewiesen werden. Während am Follikel-assoziierten hochprismatischen Epithel des Rektums umschriebene Mikrokolonien zu finden sind, adhätieren die Bakterien an der kutanen Schleimhaut des Rektums diffus [162]. Dies entspricht dem oben aufgeführten Bild der Adhärenz des Ausbruchstammes an die kutane Schleimhaut. Der LEE, welcher für die Kolonisation der Drüschleimhaut eine essentielle Rolle spielt [214, 215], scheint nicht an der Adhärenz des Erregers an der kutanen Schleimhaut beteiligt zu sein [163]. Das *outer membrane protein A* (OmpA), aber auch das Iha werden als Adhäsionsfaktoren diskutiert [165]. Obwohl diese Gene auch beim Ausbruchstamm nachgewiesen werden konnten [44, 184], kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden, ob sie für die Anheftung an das Epithel ebenfalls eine Rolle spielen oder ob sich die Mechanismen grundlegend unterscheiden. Ebenfalls fraglich ist in dem Zusammenhang, ob der Ausbruchstamm nicht auch an anderen GIT-Lokalisationen mit kutaner Schleimhaut, wie z.B. dem Pansen, kolonisieren kann. In der vorliegenden Studie kann dazu jedoch keine Aussage getroffen werden, da keine immunhistologische Untersuchung dieser Lokalisationen erfolgte. Neben einem gewissen Gewebetropismus für kutane Schleimhaut zeigte sich jedoch auch eine Präferenz der Bakterien des Ausbruchstammes für beschädigte Mukosa. Vielfach sind spezifisch markierte Erreger des Stammes LB226692 in unseren Untersuchungen frei an vorgeschädigten Lokalisationen des Darmgewebes, z.B. in ulzerativen Veränderungen mit massivem Einstrom von polymorphkernigen Leukozyten (PMN), zu finden. Möglich ist, dass Erreger des Stammes LB226692 auslösendes Agens für den massiven Einstrom an PMN sind. Beim Menschen ist bekannt, dass EAEC zu einer milden Entzündungsantwort mit Ödembildung und mononukleärer Infiltration in der Submukosa führen [308]. Auch klassische STEC induzieren eine Transmigration von PMN durch das intestinale Epithel sowie eine vermehrte Sekretion von IL-8 [127]. Auch Koinfektionen mit anderen Darmerregern könnte eine Bedeutung in diesem Geschehen zukommen. In unseren Untersuchungen konnten bei den Kälbern nicht nur verschiedene Darmparasiten nachgewiesen werden, mittels PCR wurden vor der Inokulation auch Stx-Gene im Kot der Kälber festgestellt. Da Stx-Gene nahezu

ausschließlich bei STEC anzutreffen sind [145, 210], kann der Nachweis von *stx* in Kotproben mit der Ausscheidung von STEC gleichgesetzt werden. Die hohe Prävalenz von STEC bei den Versuchstieren vor Versuchsbeginn entspricht den in der Literatur gemachten Angaben [33, 34, 97, 316]. In der Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung konnten 4 dpi Epithel-assoziierte Bakterien histologisch nachgewiesen werden, die sich jedoch in den meisten Fällen in der Immunhistologie nicht spezifisch anfärbten. Dieser Befund deutet auf eine Koinfektion mit anderen sich an die Darmschleimhaut adhärierenden Mikroorganismen hin, wobei andere STEC-Stämme nicht auszuschließen sind. Häufig wurde dies auch in anderen Studien beobachtet [45, 73]. Eine Interaktion zwischen den bereits vorhandenen STEC und den Inokulationsstämmen ist genauso wenig wie eine Interaktion mit anderen Darmbakterien auszuschließen und muss bei der Deutung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Neben dem positiven Effekt anderer Mikroorganismen auf eine Kolonisation des Ausbruchstammes z.B. durch Schaffung von prädisponierten Stellen, kommt jedoch auch ein hemmender Effekt in Betracht. In einigen Studien konnte z.B. der inhibitorische Effekt des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 auf den Ausbruchstamm nachgewiesen werden [194, 250] und auch bei Infektionen mit klassischen STEC zeigten sich immer wieder inhibitorische Effekte anderer Bakterien [224, 331]. Da der Ausbruchstamm bereits vorhandene Schädigungen des Epithels und Ansammlungen von PMN als biologische Nische zu nutzen scheint, hängt die Bedeutung des Rindes als mögliches Reservoir für diesen neuartigen *E. coli*-Stamm auch von Vorerkrankungen und Koinfektionen ab. Dies entspricht jedoch den in landwirtschaftlichen Betrieben herrschenden Bedingungen, während die Verwendung von spezifisch pathogenfreien Tieren bzw. in experimentellen Haltungsbedingungen gezogenen Tieren ohne Begleitinfektionen zu falschen Schlussfolgerungen Anlass geben könnte.

Zur Überprüfung einer Immunantwort wurden Serumproben der Kälber auf das Vorhandensein von Stx-spezifischen Antikörpern im Verozell-Neutralisationstest (Vero-NT) untersucht. Bei 24 von 30 Tieren konnten vor der Inokulation neutralisierende Stx1-spezifische Serumantikörper (Stx1-Ak) nachgewiesen werden. Dies entspricht Angaben in der Literatur, wonach Stx1-Ak bei Rindern relativ häufig nachweisbar sind [42, 90, 137, 235]. Erstaunlich ist die hohe Prävalenz an Stx1-Ak-positiven Kälbern jedoch im Hinblick auf das Alter der Tiere, da in einer Verlaufsstudie die meisten der Tiere erst ab einem Alter von ca. einem halben Jahr Stx1-Ak bildeten [90]. Auch die Ergebnisse der bakteriologischen Vortestung sprechen dafür, dass sich einige der Kälber bereits vor der Inokulation mit STEC auseinander gesetzt haben. Bei 6 Tieren konnte kein Neutralisationstiter detektiert werden, obwohl zwei dieser Tiere nachweislich *stxI*-Gene in den Kotproben ausschieden. Es wäre

möglich, dass die Tiere erst kurz vor der Beprobung den ersten Kontakt zu STEC hatten und sich somit noch keine Immunantwort entwickeln konnte. Eines der in der ersten Beprobung negativen Tiere entwickelte über den Versuchsverlauf Antikörper gegen Stx1. Bei diesem Tier konnten bereits bei der Vortestung *stx1*-Gene im Kot nachgewiesen werden, eine andauernde Infektion während des Versuches oder ein hoher Infektionsdruck durch eine ständige Reinfektion durch andere Stx1-ausscheidenden Kälber seiner Gruppe könnten zur Antikörperbildung geführt haben. Auswirkungen des Stx1-Ak-Titers der Kälber auf die Ausscheidung der Inokulationsstämme sind unwahrscheinlich, da es sich bei den Stämmen LB226692 und 86-24 Nal um Stx2-positive Stämme handelt und Stx1-Ak nicht in der Lage sind Stx2 zu neutralisieren [267, 287].

Bei keinem der Tiere konnten vor der Inokulation neutralisierende Stx2-spezifische Serumantikörper (Stx2-Ak) nachgewiesen werden, obwohl bei 15 Tieren *stx2*-Gene im Kot detektiert werden konnten. Dies deckt sich mit verschiedenen Studien über die niedrige Seroprävalenz von Stx2-Ak nach natürlichen Infektionen [42, 235]. Auch die Inokulation mit hohen Dosen ( $10^{10}$  KbE) von Stx2-exprimierenden STEC führte wie schon in früheren Studien nicht zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern [118, 137]. Eine geringere Immunogenität von Stx2 verglichen mit Stx1 bei Rindern könnte als Ursache in Betracht kommen [42, 137, 235].

### 7.3 Charakterisierung der LB226692-Re-Isolate

Die aus Kot- und Darminhalts- und Darmgewebeprobe gewonnenen LB226692-Re-Isolate wurden mittels Multiplex-PCR und Plasmid-Präparation weiter charakterisiert, um genetische Veränderungen des Ausbruchstammes nach der Darmpassage aufzudecken. Dabei fiel auf, dass mit zunehmender Versuchsdauer der prozentuale Anteil *aggR*-negativer Einzelkolonien stetig zunahm und schließlich ab 12 dpi bei 100 % lag. Der Verlust des pAA-Plasmides ging dabei besonders sprunghaft zwischen dem 4. und 6. dpi von ca. 40 % auf ca. 90 % *aggR*-negative Kolonien vorstatten. Da die Ergebnisse der Plasmid-Präparation in allen Fällen mit den Ergebnissen der PCR übereinstimmten, ist davon auszugehen, dass ein Fehlen des Genlokus *aggR* mit einem vollständigen Verlust des pAA-Plasmides einhergeht. Der Verlust des pAA-Plasmids mit zunehmender Infektionsdauer wurde auch bereits während des Ausbruchgeschehens 2011 beim Menschen beobachtet und führte zu einer verringerten Adhärenz des Erregers an die Darmschleimhaut und somit zu einer verringerten systemischen Absorption von Stx. Folglich wurde die Fähigkeit des Ausbruchstammes HUS zu induzieren hierdurch reduziert [40, 328]. Da beim Rind bisher keine typischen, d.h. *aggR*-positiven

EAEC nachgewiesen werden konnten, ist die Bedeutung des pAA-Plasmides für die Adhärenz an die bovine Schleimhaut nicht bekannt. Auswirkungen des Verlustes des pAA-Plasmides auf die Kolonisation im Rinderdarm sind somit fraglich. Für die Hypothese, dass dem pAA-Plasmid keine größere Bedeutung bei der Besiedlung des bovinen Intestinums zukommt, spricht nicht nur, dass die *aggR*-negativen Re-Isolate über einen relativ langen Zeitraum von 12 bis 24 dpi nachgewiesen werden konnten, sondern auch die fehlende Ausbildung einer aggregativen Adhärenz an die Darmschleimhaut.

Aufgrund der Instabilität des pAA-Plasmides, stellte sich die Frage wie stabil sich das *Extended-Spektrum Beta-Laktamase* (ESBL)-Plasmid verhält. Dafür wurden einerseits auf einem Nicht-ESBL-Selektivnährmedium (Gassner-Agar) aus Kotproben angezüchtete LB226692-Re-Isolate auf das Vorkommen des ESBL-Plasmides untersucht. Andererseits wurden auch *rfb*<sub>0104</sub>-negative Isolate mit ESBL-Phänotyp aus den Kotproben isoliert und auf das Vorkommen des ESBL-Plasmides getestet. Die Existenz des pESBL bei diesen *rfb*<sub>0104</sub>-negativen Isolaten hätte Hinweise auf eine erhöhte Mobilität dieses genetischen Elements liefern können. Bei allen *rfb*<sub>0104</sub>-positiven Isolaten konnte sowohl in der Multiplex-PCR eine ESBL vom Typ CTX-M-15 und eine Beta-Laktamase des Types TEM-1, sowie in der Plamid-Präparation ein im Molekulargewicht entsprechendes Plasmid nachgewiesen werden. Dagegen gelang nur für 3 *rfb*<sub>0104</sub>-negative Isolate der Nachweis einer ESBL vom Typ CTX-M-15 und einer Beta-Laktamase des Types TEM-1. Diese Isolate enthielten jedoch ein in der Größe vom pESBL abweichendes Plasmid. Das ESBL-Plasmid stellt somit, wie im Ausbruchgeschehen 2011 bei humanen Infektionen [310], auch bei intestinalen Infektionen des Rindes ein relativ stabiles genetisches Element des Stammes LB226692 dar, das auch in Anwesenheit anderer *E. coli* mit abweichenden ESBL-Plasmiden im gleichen Mikrobiom, nicht verloren wird.

Im Rahmen der Multiplex-PCR-Untersuchung fiel weiterhin auf, dass 10 LB226692-Re-Isolate zusätzlich ein *astA*-Gen besaßen, obwohl für den Ausbruchstamm von 2011 kein *astA*-Genlokus beschrieben wurde. *astA*, welches das EAST1 kodiert, wurde zuerst in EAEC entdeckt [255], ist jedoch auch häufig bei anderen *E. coli*-Pathovaren oder Bakteriengenera zu finden [186, 256, 306]. Es kann auf einem Plasmid oder im Chromosom, in einer oder mehreren Kopien kodiert sein. Es gibt verschiedene Varianten des EAST1. Die Lage des *astA* auf Transposon-ähnlichen Sequenzen, neben Insertionselementen oder invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*), könnte eine Übertragung des Gens vereinfachen [186]. Das *astA*-Gen könnte somit von einigen Bakterienzellen des

Stammes LB226692 während der Tierpassage aufgenommen worden sein. Fraglich ist, ob die Aufnahme eines zusätzlichen Virulenzfaktors der EAEC Einfluss auf das Kolonisationsverhalten des Stammes hat. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass mit der Aufnahme des Gens auch eine Expression des Zytotoxins einhergeht [256]. EAST1 wird immer wieder mit Diarrhoe bei Kälbern in Verbindung gebracht [186]. Auffällig ist, dass besonders viele der *astA*-positiven Isolate von einem Tier stammen. Bei diesem Tier konnten an der RAJ spezifisch markierte adhärierende, sowie an der ICE viele spezifisch markierte freie Bakterien nachgewiesen werden. Auffällig waren bei diesem Tier zystische Veränderungen lymphoglandulärer Komplexe an der ICE und eine ulzerative Proktitis. Ob dies auf EAST1 zurückzuführen ist, ist aufgrund der Schwere und Dauer des Bestehens der Befunde fraglich. Möglich wäre jedoch, dass die durch EAST1 verursachten Epithelschäden eine Kolonisation des Stammes LB226692 unterstützen.

#### 7.4 Fazit

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Stamm LB226692 in der Lage ist, den Darm von Wiederkäuern über einen bestimmten Zeitraum zu kolonisieren. Wie bei klassischen STEC hat die Infektion keine Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden der Kälber. Der Stamm LB226692 unterscheidet sich jedoch in der Höhe und Dauer der Ausscheidung sowie im Adhärenzmuster von klassischen STEC. Der Stamm LB226692 scheint damit nicht so gut an das Rind adaptiert zu sein wie klassische STEC. Dennoch wird der Stamm über einen Zeitraum von mehreren Wochen ausgeschieden und zeigt eine besondere Form der Adhärenz an das bovine Intestinum. Unklar bleibt aufgrund des Versuchsaufbaus, ob der Erreger nach dieser Zeit vollständig aus einer Rinderpopulation getilgt wird oder ob er über den hier untersuchten Zeitraum hinaus intermittierend ausgeschieden wird. Der Ausbruchstamm unterliegt wie auch andere *E. coli*-Stämme einem ständigen Wandel. Im Verlauf der Infektion wurden Virulenzfaktoren wie *astA* aufgenommen, andere Virulenzfaktoren wie das pAA-Plasmid gingen verloren, während weitere Merkmale wie das ESBL-Plasmid erhalten blieben. Auch wenn der Stamm bisher noch nicht in der Rinderpopulation nachgewiesen werden konnte, sind seine genetischen Merkmale in einzelnen Rinderherden zeitgleich nachweisbar [12, 228]. Die Neuentstehung eines solchen Stammes ist auch in Zukunft nicht ausgeschlossen. Auch der Eintrag in die Rinderpopulation durch das Zirkulieren des Ausbruchstammes in der humanen Population ist möglich. Im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie ist eine anschließende Verbreitung des Stammes in der Rinderpopulation nicht unwahrscheinlich. Auch eine niedrige Ausscheidungshöhe über wenige Wochen birgt

ein hohes Risiko für die (Rück-)Übertragung auf den Menschen, da bereits eine sehr niedrige Infektionsdosis zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung beim Menschen führen kann [10, 151]. Da Rinder als Reservoir für neuartige STEC/EAEC-Stämme grundsätzlich in Frage kommen, bedarf es einer Anpassung der diagnostischen Methoden für das Zoonose-Monitoring, um solchen Stämme in Zukunft schneller zu identifizieren.

### 7.5 Ausblick

Für zukünftige Untersuchungen wären einige Modifikationen im Infektionsmodell denkbar. Für den Ausschluss einer intermittierenden Ausscheidung oder einer ständigen Reinfektion der Tiere in den Versuchsgruppen müssten Langzeitstudien unter teilweise veränderten Haltungsbedingungen (Einzelhaltung) durchgeführt werden. Auch der Einsatz neonataler Kälber oder adulter Rinder könnte neue Erkenntnisse zur Empfänglichkeit der Tiere liefern. Mögliche Auswirkungen einer Infektion auf immunsupprimierte Kälber könnten durch ein bereits gut etabliertes Modell untersucht werden. Durch die Behandlung mit Dexamethason wird die Kolonisation der STEC-Stämme im Gastrointestinaltrakt von Kälbern erleichtert [74]. Das Modell imitiert Stressbelastungen, wie sie unter landwirtschaftlichen Haltungsbedingungen auftreten können, und ist hinsichtlich der Wirkung auf die Immunantwort umfassend charakterisiert [188]. Der Einsatz spezifisch pathogenfreier Tiere könnte Wechselwirkungen mit anderen Darmbakterien (z.B. andere STEC-Stämme) sowie für eine Infektion prädisponierende Faktoren minimieren. Ein nächster Schritt zur Untersuchung des Kolonisationsverhaltens des *E. coli*-Stammes LB226692 im Rinderdarm wäre die Identifizierung einzelner Kolonisationsfaktoren. Der Einsatz von *stx*-, *pAA*- oder *Iha*-negativen Derivaten könnte Aufschluss über deren Bedeutung für die Kolonisation geben. Auch der Vergleich mit klassischen EAEC wäre möglich. Bei der Auswertung der Versuche sollte des Weiteren ein Augenmerk auf die besondere Form der Adhärenz des Stammes LB226692 gelegt werden. Hinweise auf eine gewisse Präferenz des Erregers für die kutane Schleimhaut der RAJ bedürfen ebenso weiterer Untersuchungen wie die in der Immunhistologie als fraglich eingestufteten Lokalisationen.

## 8 Zusammenfassung

Mit dem EHEC-Stamm des Serotyps O104:H4 trat im Jahr 2011 ein neuartiger *E. coli*-Stamm auf, der die Eigenschaften zweier verschiedener *E. coli*-Pathovaren - der Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) und der enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) - verband. EAEC-Stämme konnten bislang nicht bei Rindern nachgewiesen werden, die das Hauptreservoir für STEC-Stämme darstellen. Da nicht auszuschließen ist, dass Stämme wie der EHEC-Stamm O104:H4 in Nutztierpopulationen eingetragen werden, ergab sich die Frage, ob Stämme mit solchen genetischen Merkmalen in der Lage wären, dauerhaft den Darm von Wiederkäuern zu kolonisieren und somit die Speziesbarriere vom Menschen zum Tier zu überwinden.

Unter Nutzung eines etablierten Infektionsmodells mit Kälbern wurden zwei Teilversuche (TV1 und TV2) mit einer Versuchsdauer von 4 d bzw. 28 d durchgeführt. Je Teilversuch wurden 5 ca. 100 Tage alte Kälber mit dem EHEC-Stamm des Serotyps O104:H4 (humanes Isolat LB226692 aus dem Ausbruchgeschehen 2011; *stx2*-positiv), und weitere je 5 Kälber mit dem STEC O157:H7-Stamm 86-24 Nal (Positivkontrolle; *stx2*-positiv) bzw. mit dem kommensalen *E. coli*-Stamm 123 (Negativkontrolle; *stx*-negativ) inokuliert. Alle Kälber blieben während der gesamten Versuchsdauer klinisch unauffällig. In 24 von 30 Tieren waren vor der Inokulation Shigatoxin 1 (Stx1) -neutralisierende Antikörper (Stx1-Ak) nachweisbar. Eines der Tiere inokuliert mit Stamm LB226692 entwickelte während des Versuches messbare anti-Stx1 Titer. Bei keinem der Kälber konnten vor der Inokulation oder am letzten Tag der Versuche Stx2-Ak nachgewiesen werden.

Durch Bestimmung der Zahl Kolonie-bildender Einheiten (KbE), Beurteilung der Koloniemorphologie und Bestätigung des Serotyps wurde die Keimzahl des entsprechenden Inokulationsstammes im Kot bestimmt und die Ergebnisse über Koloniehybridisierung und Multiplex-PCR bestätigt. In allen Inokulationsgruppen variierten die Dauer und Höhe der fäkalen Ausscheidung stark. Der Stamm LB226692 wurde am ersten und zweiten Tag nach Inokulation (dpi) mit einer maximalen Keimzahl von  $2,4 \times 10^7$  KbE/g Kot ausgeschieden. Die Ausscheidung variierte 4 dpi zwischen fehlendem Nachweis und einer Ausscheidung von  $6,6 \times 10^5$  KbE/g Kot. Im weiteren Versuchsverlauf fiel die Menge ausgeschiedener Bakterien des Stammes LB226692 bis unter die Nachweisgrenze ab, war jedoch bei einem Tier bis 24 dpi nachweisbar. Vier Tage nach Inokulation konnte der Stamm sowohl im Darminhalt (bis zu  $5,6 \times 10^7$  KbE/g) als auch assoziiert mit dem Darmgewebe nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang aus dem Pansen, dem Labmageninhalt und der Galle. Ähnlich wie der Kontrollstamm 86-24 Nal war LB226692 nur vereinzelt mit Dünndarmgewebe assoziiert. Im

Übergang zum und im Dickdarm erfolgte der Nachweis bei 4 Tieren an allen Beprobungspunkten mit bis zu  $1,3 \times 10^7$  KbE/g Darmgewebe. Bei 3 Tieren wurde LB226692 an der rektoanalen Übergangszone mit bis  $6,5 \times 10^6$  KbE/g Darmgewebe nachgewiesen. Bei der Sektion 28 dpi war LB226692 weder im Darminhalt noch am Darmgewebe nachweisbar.

Keines der Tiere wies 4 dpi signifikante makroskopische oder histologische Veränderungen der Dün- oder Dickdarmschleimhaut auf. Adhätierende Bakterien des Stammes LB226692 waren bei einem Tier immunhistologisch an der kutanen Schleimhaut des Rektums, nicht jedoch im Bereich der dortigen Drüsenschleimhaut, zu finden. Bei diesem Tier traten spezifisch markierte Bakterien auch an mehreren ulzerativen Veränderungen der Darmschleimhaut auf. Bei einem anderen Tier konnten spezifisch markierte *E. coli* des Stammes LB226692 im Nekrosebereich einer Tonsillarkrypte (Kryptabszess) nachgewiesen werden.

Alle untersuchten Re-Isolate von LB226692 enthielten die ESBL-Genloki und das pESBL. Zehn Re-Isolate besaßen nach Tierpassage zusätzlich ein *astA*-Gen, das dem Ausbruchstamm fehlt. Dagegen hatten 116 von 315 untersuchten LB226692-Re-Isolaten das *aggR*-Gen und das entsprechende Plasmid (pAA) während der Tierpassage verloren. Der prozentuale Anteil *aggR*-negativer Einzelkolonien nahm über die Versuchsdauer kontinuierlich zu.

Der EHEC-Stamm LB226692 des Serotyps O104:H4 ist somit in der Lage, den Darm von Wiederkäuern klinisch inapparent über einen bestimmten Zeitraum zu kolonisieren. Der Stamm ist in deutlich höheren Keimzahlen und über einen wesentlich längeren Zeitraum als der kommensale Stamm 123 nachweisbar, jedoch in geringeren Keimzahlen und kürzer als klassische STEC. Dies spricht für eine schlechtere Adaption des Stammes LB226692 an das bovine Intestinum als bei klassischen STEC, jedoch unterliegt der Stamm nachweislich wie auch andere *E. coli*-Stämme einem ständigen Wandel durch Aufnahme und Verlust von Genen für Virulenzfaktoren. Es ist deshalb davon auszugehen, dass Rinder als Reservoir für STEC/EAEC-Stämme und als Quelle einer Übertragung auf den Menschen fungieren können.

## 9 Summary

In 2011, a novel enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain of serotype O104:H4, possessing a combination of virulence factors of both Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* (STEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) strains, caused an unprecedented, food-borne outbreak in humans. *E. coli* strains belonging to the EAEC pathovar have not been detected in cattle, the primary STEC/EHEC reservoir, so far. As exposure of the cattle population to EHEC/EAEC hybrid strains like EHEC O104:H4 can occur, the current study aimed at assessing the possibility that strains with this genetic make-up can utilize ruminants as reservoir allowing such strains to cross the interspecies barrier from humans to livestock.

We used a well described bovine infection model for two experiments lasting 4 and 28 d, respectively. In each trial, fifteen (five per strain) approx. 100-day-old weaned calves were inoculated with EHEC strain of serotype O104:H4 (LB226692; isolated from a human patient during the outbreak 2011; *stx2*-positive), with STEC O157:H7 strain 86-24 Nal (positive control; *stx2*-positive) or with non-pathogenic *E. coli* O43:H28 strain 123 (negative control; *stx*-negative). All calves remained clinically normal throughout the experiments. Before inoculation, neutralizing antibodies against Stx1 were detectable in 24 of 30 animals. One calf inoculated with strain LB226692 developed antibodies to Stx1 during the experiment. None of the calves had neutralizing antibodies against Stx2 before the inoculation or on the last day of the experiment.

For quantification of the inoculum strains in feces, colony-forming units (CFU) were counted, colony morphology was evaluated, the serotype confirmed, and the results were approved by hybridization and multiplex PCR. Magnitude and duration of detectable shedding varied among individuals in all inoculation groups. Bacteria of EHEC strain LB226692 were shed in maximum numbers of  $2.4 \times 10^7$  CFU/g feces on the first and second day post inoculation (dpi). Fecal shedding varied by 4 dpi between missing detection and  $6.6 \times 10^5$  CFU/g feces. In the 28 d trial, numbers of LB226692 bacteria shed eventually decreased below the detection limit. However shedding was detectable until 24 dpi in a single animal. EHEC O104:H4 could be recovered from intestinal content (up to  $5.6 \times 10^7$  CFU/g) as well as from mucosal tissue samples at 4 dpi. Isolation was possible from the rumen, the content of the abomasum and the bile. The outbreak strain LB226692, similar to the positive control strain 86-24 Nal, was only sporadically associated with the small intestinal mucosa. At the transition to and in the large intestine detection was possible in 4 animals at every sampling spot with up to  $1.3 \times 10^7$  CFU/g tissue sample. In 3 animals LB226692 was detected at the rectoanal junction

with up to  $6.5 \times 10^6$  CFU/g tissue sample. At necropsy 28 dpi LB226692 was neither detectable in intestinal content nor associated with intestinal tissue.

Gross pathological or histological abnormalities of the small or large intestinal mucosa were vastly absent in any of the calves 4 dpi. Adherent bacteria of strain LB226692 were immunohistochemically detectable in one calf at the squamous epithelium of the rectum, but not in the area of the columnar epithelium. In this calf, specifically stained bacteria were also found at several ulcerative alterations of the intestinal mucosa. In another calf *E. coli* of strain LB226692 were detectable in a necrotic area of a tonsillar crypt (crypt abscess).

All tested re-isolates of LB226692 contained the ESBL gene loci and the pESBL. Ten re-isolates possessed an additional *astA*, which the outbreak strain lacked. In contrast, 116 of 315 LB226692-re-isolates had lost the *aggR*-gene and the corresponding plasmid (pAA) during animal passage. The percentage of *aggR* negative colonies steadily increased in the course of the experiment.

In conclusion, EHEC strain LB226692 of serotype O104:H4 is able to colonize the intestine of ruminants asymptotically for a significant period of time. The outbreak strain has been recovered in considerably higher numbers and for a longer time period than the commensal strain 123, but in lower numbers and for a shorter period than a classical STEC strain. EHEC O104:H4 appear to be less well adapted to bovine intestine as compared to classical STEC. However, *E. coli* strains are subject to a steady change through uptake and loss of genetic information encoding for virulence factors. It must be considered, therefore, that cattle can serve as reservoir for STEC/EAEC strains and a source of transmission to the human population.

## 10 Referenzen

1. **Acheson D.W., R. Moore, S. De Breucker, L. Lincicome, M. Jacewicz, E. Skutelsky, and G.T. Keusch.** 1996. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun*, **64**(8): p. 3294-300.
2. **Adachi J.A., J.J. Mathewson, Z.D. Jiang, C.D. Ericsson, and H.L. DuPont.** 2002. Enteric pathogens in Mexican sauces of popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *Ann Intern Med*, **136**(12): p. 884-7.
3. **Ahmed S.A., J. Awosika, C. Baldwin, K.A. Bishop-Lilly, B. Biswas, S. Broomall, P.S. Chain, O. Chertkov, O. Chokoshvili, S. Coyne, K. Davenport, J.C. Detter, W. Dorman, T.H. Erkkila, J.P. Folster, K.G. Frey, M. George, C. Gleasner, M. Henry, K.K. Hill, K. Hubbard, J. Insalaco, S. Johnson, A. Kitzmiller, M. Krepps, C.C. Lo, T. Luu, L.A. McNew, T. Minogue, C.A. Munk, B. Osborne, M. Patel, K.G. Reitenga, C.N. Rosenzweig, A. Shea, X. Shen, N. Strockbine, C. Tarr, H. Teshima, E. van Gieson, K. Verratti, M. Wolcott, G. Xie, S. Sozhamannan, and H.S. Gibbons for the Threat Characterization Consortium.** 2012. Genomic comparison of *Escherichia coli* O104:H4 isolates from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage stx2. *Plos One*, **7**(11): p. e48228.
4. **Aidar L., A.S. Penteado, L.R. Trabulsi, J.E. Blanco, M. Blanco, J. Blanco, and A.F. Pestana de Castro.** 2000. Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil. *Can J Vet Res*, **64**(1): p. 15-20.
5. **Aikman P.C., C.K. Reynolds, and D.E. Beaver.** 2008. Diet digestibility, rate of passage, and eating and rumination behavior of Jersey and Holstein cows. *J Dairy Sci*, **91**(3): p. 1103-14.
6. **Akashi S., K. Joh, A. Tsuji, H. Ito, H. Hoshi, T. Hayakawa, J. Ihara, T. Abe, M. Hatori, T. Mori, and et al.** 1994. A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Eur J Pediatr*, **153**(9): p. 650-5.
7. **Al Safadi R., G.S. Abu-Ali, R.E. Sloup, J.T. Rudrik, C.M. Waters, K.A. Eaton, and S.D. Manning.** 2012. Correlation between in vivo biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104:H4. *Plos One*, **7**(7): p. e41628.
8. **Allen K.J., D. Rogan, B.B. Finlay, A.A. Potter, and D.J. Asper.** 2011. Vaccination with type III secreted proteins leads to decreased shedding in calves after experimental infection with *Escherichia coli* O157. *Can J Vet Res*, **75**(2): p. 98-105.
9. **Anderson B.H., D.L. Watson, and I.G. Colditz.** 1999. The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Vet Res Commun*, **23**(7): p. 399-413.
10. **Appel B., G.F. Böl, M. Greiner, M. Lahrssen-Wiederholt, and A. Hensel (Hrsg.).** 2011. EHEC Ausbruch 2011- Aufklärung des Ausbruchs entlang der Lebensmittelkette. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR-Wissenschaft 04/2011). <http://www.bfr.bund.de/>
11. **ATCC.** VERO 76 (ATCC® CRL-1587™) <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1587.aspx?slp=1> [abgerufen am 24.10.2014]
12. **Auvray F., F. Dilasser, D. Bibbal, M. Kerouredan, E. Oswald, and H. Brugere.** 2012. French cattle is not a reservoir of the highly virulent enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4. *Veterinary Microbiology*, **158**(3-4): p. 443-5.
13. **Bannas P., K. Fraedrich, A. Treszl, T.A. Bley, J. Herrmann, C.R. Habermann, T. Derlin, F.O. Henes, U. Wenzel, G. Adam, and J. Yamamura.** 2013. Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak 2011 in Germany: radiological features of enterohemorrhagic colitis. *Rofo*, **185**(5): p. 434-9.

14. **Baumler A.J., R.M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(1): p. 279-83.
15. **Behrens M., J. Sheikh, and J.P. Nataro.** 2002. Regulation of the overlapping pic/set locus in *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **70**(6): p. 2915-25.
16. **Bell B.P., M. Goldoft, P.M. Griffin, M.A. Davis, D.C. Gordon, P.I. Tarr, C.A. Bartleson, J.H. Lewis, T.J. Barrett, J.G. Wells, and et al.** 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA*, **272**(17): p. 1349-53.
17. **Belongia E.A., M.T. Osterholm, J.T. Soler, D.A. Ammend, J.E. Braun, and K.L. MacDonald.** 1993. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *JAMA*, **269**(7): p. 883-8.
18. **Benjamin M.M. and A.R. Datta.** 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, **61**(4): p. 1669-72.
19. **Benjamin P., M. Federman, and C.A. Wanke.** 1995. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **63**(9): p. 3417-21.
20. **Berg J., T. McAllister, S. Bach, R. Stilborn, D. Hancock, and J. LeJeune.** 2004. *Escherichia coli* O157:H7 excretion by commercial feedlot cattle fed either barley- or corn-based finishing diets. *J Food Prot*, **67**(4): p. 666-71.
21. **Bernier C., P. Gounon, and C. Le Bouguenec.** 2002. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun*, **70**(8): p. 4302-11.
22. **Besser R.E., S.M. Lett, J.T. Weber, M.P. Doyle, T.J. Barrett, J.G. Wells, and P.M. Griffin.** 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA*, **269**(17): p. 2217-20.
23. **Besser T.E., D.D. Hancock, L.C. Pritchett, E.M. McRae, D.H. Rice, and P.I. Tarr.** 1997. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *Journal of Infectious Diseases*, **175**(3): p. 726-9.
24. **Besser T.E., B.L. Richards, D.H. Rice, and D.D. Hancock.** 2001. *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol Infect*, **127**(3): p. 555-60.
25. **Beutin L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(3): p. 1099-108.
26. **Beutin L., J.A. Hammerl, J. Reetz, and E. Strauch.** 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle as a source of the Stx2a bacteriophages present in enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 strains. *Int J Med Microbiol*.
27. **Bhan M.K., P. Raj, M.M. Levine, J.B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S. Sazawal.** 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J Infect Dis*, **159**(6): p. 1061-4.
28. **Bielaszewska M., A. Mellmann, W. Zhang, R. Kock, A. Fruth, A. Bauwens, G. Peters, and H. Karch.** 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*, **11**(9): p. 671-6.

29. **Bielaszewska M., E.A. Idelevich, W. Zhang, A. Bauwens, F. Schaumburg, A. Mellmann, G. Peters, and H. Karch.** 2012. Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrob Agents Chemother*, **56**(6): p. 3277-82.
30. **Bitzan M., S. Richardson, C. Huang, B. Boyd, M. Petric, and M.A. Karmali.** 1994. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infect Immun*, **62**(8): p. 3337-47.
31. **Bitzan M.M., Y. Wang, J. Lin, and P.A. Marsden.** 1998. Verotoxin and ricin have novel effects on preproendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide synthase (ecNOS) expression and NO production in vascular endothelium. *J Clin Invest*, **101**(2): p. 372-82.
32. **Bjork S., M.E. Breimer, G.C. Hansson, K.A. Karlsson, and H. Leffler.** 1987. Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. *J Biol Chem*, **262**(14): p. 6758-65.
33. **Blanco M., J.E. Blanco, J. Blanco, E.A. Gonzalez, A. Mora, C. Prado, L. Fernandez, M. Rio, J. Ramos, and M.P. Alonso.** 1996. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol Infect*, **117**(2): p. 251-7.
34. **Blanco M., J.E. Blanco, J. Blanco, A. Mora, C. Prado, M.P. Alonso, M. Mourino, C. Madrid, C. Balsalobre, and A. Juarez.** 1997. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Vet Microbiol*, **54**(3-4): p. 309-19.
35. **Blanco M., J.E. Blanco, A. Mora, G. Dahbi, M.P. Alonso, E.A. Gonzalez, M.I. Bernardez, and J. Blanco.** 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). *J Clin Microbiol*, **42**(2): p. 645-51.
36. **Blanco M., N.L. Padola, A. Kruger, M.E. Sanz, J.E. Blanco, E.A. Gonzalez, G. Dahbi, A. Mora, M.I. Bernardez, A.I. Etcheverria, G.H. Arroyo, P.M. Lucchesi, A.E. Parma, and J. Blanco.** 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol*, **7**(4): p. 269-76.
37. **Boisen N., C. Struve, F. Scheutz, K.A. Kroghfelt, and J.P. Nataro.** 2008. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect Immun*, **76**(7): p. 3281-92.
38. **Boisen N., F. Ruiz-Perez, F. Scheutz, K.A. Kroghfelt, and J.P. Nataro.** 2009. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg*, **80**(2): p. 294-301.
39. **Boisen N., F. Scheutz, D.A. Rasko, J.C. Redman, S. Persson, J. Simon, K.L. Kotloff, M.M. Levine, S. Sow, B. Tamboura, A. Toure, D. Malle, S. Panchalingam, K.A. Kroghfelt, and J.P. Nataro.** 2012. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *J Infect Dis*, **205**(3): p. 431-44.
40. **Boisen N., A.M. Hansen, A.R. Melton-Celsa, T. Zangari, N.P. Mortensen, J.B. Kaper, A.D. O'Brien, and J.P. Nataro.** 2014. The Presence of the pAA Plasmid in the German O104:H4 Shiga Toxin Type 2a (Stx2a)-Producing Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain Promotes the Translocation of Stx2a Across an Epithelial Cell Monolayer. *Journal of Infectious Diseases*, **210**(12): p. 1909-19.
41. **Borczyk A.A., M.A. Karmali, H. Lior, and L.M. Duncan.** 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, **1**(8524): p. 98.

42. **Bormaneby H.C., S.A. Mcewen, R.C. Clarke, W.B. McNab, K. Rahn, and A. Valdiviesogarcia.** 1993. The Seroprevalence of Verocytotoxin-Producing *Escherichia-Coli* in Ontario Dairy-Cows and Associations with Production and Management. *Preventive Veterinary Medicine*, **15**(4): p. 261-274.
43. **Bretschneider G., E.M. Berberov, and R.A. Moxley.** 2007. Isotype-specific antibody responses against *Escherichia coli* O157:H7 locus of enterocyte effacement proteins in adult beef cattle following experimental infection. *Vet Immunol Immunopathol*, **118**(3-4): p. 229-38.
44. **Broad Institute.** *Escherichia coli* O104:H4 Database. [https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Ecoli\\_O104\\_H4/GeneDetails.html?sp=S7000006981130365](https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Ecoli_O104_H4/GeneDetails.html?sp=S7000006981130365) [abgerufen am 21.05.2015]
45. **Brown C.A., B.G. Harmon, T. Zhao, and M.P. Doyle.** 1997. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl Environ Microbiol*, **63**(1): p. 27-32.
46. **Brownlie L.E. and F.H. Grau.** 1967. Effect of food intake on growth and survival of *Salmonellas* and *Escherichia coli* in the bovine rumen. *J Gen Microbiol*, **46**(1): p. 125-34.
47. **Brzuszkiewicz E., A. Thurmer, J. Schuldes, A. Leimbach, H. Liesegang, F.D. Meyer, J. Boelter, H. Petersen, G. Gottschalk, and R. Daniel.** 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol*, **193**(12): p. 883-91.
48. **Buchholz U., H. Bernard, D. Werber, M.M. Bohmer, C. Remschmidt, H. Wilking, Y. Delere, M. an der Heiden, C. Adlhoch, J. Dreesman, J. Ehlers, S. Ethelberg, M. Faber, C. Frank, G. Fricke, M. Greiner, M. Hohle, S. Ivarsson, U. Jark, M. Kirchner, J. Koch, G. Krause, P. Luber, B. Rosner, K. Stark, and M. Kuhne.** 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med*, **365**(19): p. 1763-70.
49. **Buchko S.J., R.A. Holley, W.O. Olson, V.P. Gannon, and D.M. Veira.** 2000. The effect of different grain diets on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by steers. *J Food Prot*, **63**(11): p. 1467-74.
50. **Bundesinstitut für Risikobewertung (Hrsg.).** 2011. Fragen und Antworten zur Herkunft des Enterohämorrhagischen *E. coli* O104:H4. <http://www.bfr.bund.de/>
51. **Burk C., R. Dietrich, G. Acar, M. Moravek, M. Bulte, and E. Martlbauer.** 2003. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *J Clin Microbiol*, **41**(5): p. 2106-12.
52. **Callaway T.R., M.A. Carr, T.S. Edrington, R.C. Anderson, and D.J. Nisbet.** 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol*, **11**(2): p. 67-79.
53. **Cassar C.A., M. Ottaway, G.A. Paiba, R. Futter, S. Newbould, and M.J. Woodward.** 2004. Absence of enteroaggregative *Escherichia coli* in farmed animals in Great Britain. *Vet Rec*, **154**(8): p. 237-9.
54. **Cebula T.A., W.L. Payne, and P. Feng.** 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**(1): p. 248-50.
55. **Chaisri U., M. Nagata, H. Kurazono, H. Horie, P. Tongtawe, H. Hayashi, T. Watanabe, P. Tapchaisri, M. Chongsa-nguan, and W. Chaicumpa.** 2001. Localization of Shiga toxins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in kidneys of paediatric and geriatric patients with fatal haemolytic uraemic syndrome. *Microb Pathog*, **31**(2): p. 59-67.

56. **Chanter N., G.A. Hall, A.P. Bland, A.J. Hayle, and K.R. Parsons.** 1986. Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). *Veterinary Microbiology*, **12**(3): p. 241-53.
57. **Chapman P.A., C.A. Siddons, A.T. Gerdan Malo, and M.A. Harkin.** 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect*, **119**(2): p. 245-50.
58. **Chapman P.A.** 2000. Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, (29): p. 51S-60S.
59. **Clark M.A., B.H. Hirst, and M.A. Jepson.** 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun*, **66**(3): p. 1237-43.
60. **Cobbold R. and P. Desmarchelier.** 2000. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Veterinary Microbiology*, **71**(1-2): p. 125-37.
61. **Cobeljic M., B. Miljkovic-Selimovic, D. Paunovic-Todosijevic, Z. Velickovic, Z. Lepsanovic, N. Zec, D. Savic, R. Ilic, S. Konstantinovic, B. Jovanovic, and V. Kostic.** 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect*, **117**(1): p. 11-6.
62. **Cornick N.A., S.L. Booher, T.A. Casey, and H.W. Moon.** 2000. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. *Appl Environ Microbiol*, **66**(11): p. 4926-34.
63. **Cornick N.A., S.L. Booher, and H.W. Moon.** 2002. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect Immun*, **70**(5): p. 2704-7.
64. **Cornick N.A., A.F. Helgerson, and V. Sharma.** 2007. Shiga toxin and Shiga toxin-encoding phage do not facilitate *Escherichia coli* O157:H7 colonization in sheep. *Appl Environ Microbiol*, **73**(1): p. 344-6.
65. **Cravioto A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe, and C. Eslava.** 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet*, **337**(8736): p. 262-4.
66. **Cray W.C., Jr. and H.W. Moon.** 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, **61**(4): p. 1586-90.
67. **Cray W.C., Jr., T.A. Casey, B.T. Bosworth, and M.A. Rasmussen.** 1998. Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Appl Environ Microbiol*, **64**(5): p. 1975-9.
68. **Czczulin J.R., S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M.H. Kothary, F. Navarro-Garcia, and J.P. Nataro.** 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **65**(10): p. 4135-45.
69. **Daenicke S., U. Meyer, and L. Geue.** 2014. Dynamics of total and Shiga-toxin (Stx) forming *Escherichia coli* shedding with faeces of dairy cows experiencing a change from a low to a high caloric diet. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, **10**(1): p. 23-28.
70. **Dahme E. and E. Weiss.** 1999. Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Vol. 5. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. 3-432-80905-0.
71. **Dallman T., G.P. Smith, B. O'Brien, M.A. Chattaway, D. Finlay, K.A. Grant, and C. Jenkins.** 2012. Characterisation of a verocytotoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O111:H21 associated with a household outbreak in Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*.
72. **Dean-Nystrom E.A., B.T. Bosworth, and H.W. Moon.** 1999. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 in weaned calves. *Adv Exp Med Biol*, **473**: p. 173-7.

73. **Dean-Nystrom E.A.** 2003. Bovine *Escherichia coli* O157:H7 infection model. *Methods Mol Med*, **73**: p. 329-38.
74. **Dean-Nystrom E.A., W.C. Stoffregen, B.T. Bosworth, H.W. Moon, and J.F. Pohlenz.** 2008. Early attachment sites for Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157 : H7 in experimentally inoculated weaned calves. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(20): p. 6378-6384.
75. **DeanNystrom E.A., B.T. Bosworth, W.C. Cray, and H.W. Moon.** 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infection and Immunity*, **65**(5): p. 1842-1848.
76. **Diez-Gonzalez F., T.R. Callaway, M.G. Kizoulis, and J.B. Russell.** 1998. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science*, **281**(5383): p. 1666-8.
77. **Dudley E.G., C. Abe, J.M. Ghigo, P. Latour-Lambert, J.C. Hormazabal, and J.P. Nataro.** 2006. An Inc11 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infect Immun*, **74**(4): p. 2102-14.
78. **Eisenhauer P.B., P. Chaturvedi, R.E. Fine, A.J. Ritchie, J.S. Pober, T.G. Cleary, and D.S. Newburg.** 2001. Tumor necrosis factor alpha increases human cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to Shiga toxin. *Infect Immun*, **69**(3): p. 1889-94.
79. **European Food Safety Authority.** 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*.
80. **European Food Safety Authority.** 2011. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. *Technical Report of EFSA*.
81. **Falguieres T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero, and L. Johannes.** 2001. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell*, **12**(8): p. 2453-68.
82. **Fang G.D., A.A. Lima, C.V. Martins, J.P. Nataro, and R.L. Guerrant.** 1995. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **21**(2): p. 137-44.
83. **Fasano A., F.R. Noriega, D.R. Maneval, Jr., S. Chanasongram, R. Russell, S. Guandalini, and M.M. Levine.** 1995. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri 2a* active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *J Clin Invest*, **95**(6): p. 2853-61.
84. **Frank C., D. Werber, J.P. Cramer, M. Askar, M. Faber, M. an der Heiden, H. Bernard, A. Fruth, R. Prager, A. Spode, M. Wadl, A. Zoufaly, S. Jordan, M.J. Kemper, P. Follin, L. Muller, L.A. King, B. Rosner, U. Buchholz, K. Stark, and G. Krause.** 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*, **365**(19): p. 1771-80.
85. **Frank G.H., R.E. Briggs, and R.A. Schneider.** 1994. Characterization of *Escherichia coli* isolated from the tonsils of cattle. *J Clin Microbiol*, **32**(1): p. 256-8.
86. **Frankel G., O. Lider, R. Hershkovich, A.P. Mould, S.G. Kachalsky, D.C. Candy, L. Cahalon, M.J. Humphries, and G. Dougan.** 1996. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem*, **271**(34): p. 20359-64.
87. **Frankel G., A.D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J.B. Kaper, and S. Knutton.** 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*, **30**(5): p. 911-21.

88. **Frankel G. and A.D. Phillips.** 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cellular Microbiology*, **10**(3): p. 549-56.
89. **Friedrich A., T. Grude, W. Klee, I. Lorenz, K. Matthies, M. Metzner, G. Rademacher, and H. Wendel.** Klinische Propädeutik am Rind (Innere Medizin). <http://www.rinderskript.net/skripten/p0.html> [abgerufen am 05.01.2015]
90. **Froehlich J.** 2009. Shigatoxin-spezifische Immunglobuline und Ausscheidung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Kälbern. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen
91. **Gannon V.P., S. D'Souza, T. Graham, R.K. King, K. Rahn, and S. Read.** 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(3): p. 656-62.
92. **Garber L.P., S.J. Wells, D.D. Hancock, M.P. Doyle, J. Tuttle, J.A. Shere, and T. Zhao.** 1995. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc*, **207**(1): p. 46-9.
93. **Garrido P., M. Blanco, M. Moreno-Paz, C. Briones, G. Dahbi, J. Blanco, J. Blanco, and V. Parro.** 2006. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem*, **52**(2): p. 192-201.
94. **Gassama-Sow A., P.S. Sow, M. Gueye, A. Gueye-N'diaye, J.L. Perret, S. M'Boup, and A. Aidara-Kane.** 2004. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. *J Infect Dis*, **189**(1): p. 75-8.
95. **Geerdes-Fenge H.F., M. Lobermann, M. Nurnberg, C. Fritzsche, S. Koball, J. Henschel, R. Hohn, H.C. Schober, S. Mitzner, A. Podbielski, and E.C. Reisinger.** 2013. Ciprofloxacin reduces the risk of hemolytic uremic syndrome in patients with *Escherichia coli* O104:H4-associated diarrhea. *Infection*, **41**(3): p. 669-73.
96. **Gentry M.K. and J.M. Dalrymple.** 1980. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *Journal of Clinical Microbiology*, **12**(3): p. 361-6.
97. **Geue L., M. Segura-Alvarez, F.J. Conraths, T. Kuczius, J. Bockemuhl, H. Karch, and P. Gallien.** 2002. A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms. *Epidemiol Infect*, **129**(1): p. 173-85.
98. **Geue L.** 2014. Personal communication.
99. **Girard F., F. Dziva, P. van Diemen, A.D. Phillips, M.P. Stevens, and G. Frankel.** 2007. Adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O26, and O111 strains to bovine intestinal explants ex vivo. *Appl Environ Microbiol*, **73**(9): p. 3084-90.
100. **Grad Y.H., M. Lipsitch, M. Feldgarden, H.M. Arachchi, G.C. Cerqueira, M. Fitzgerald, P. Godfrey, B.J. Haas, C.I. Murphy, C. Russ, S. Sykes, B.J. Walker, J.R. Wortman, S. Young, Q. Zeng, A. Abouelleil, J. Bochicchio, S. Chauvin, T. Desmet, S. Gujja, C. McCowan, A. Montmayeur, S. Steelman, J. Frimodt-Moller, A.M. Petersen, C. Struve, K.A. Krogfelt, E. Bingen, F.X. Weill, E.S. Lander, C. Nusbaum, B.W. Birren, D.T. Hung, and W.P. Hanage.** 2012. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(8): p. 3065-70.
101. **Grad Y.H., P. Godfrey, G.C. Cerqueira, P. Mariani-Kurkdjian, M. Gouali, E. Bingen, T.P. Shea, B.J. Haas, A. Griggs, S. Young, Q. Zeng, M. Lipsitch, M.K. Waldor, F.X. Weill, J.R. Wortman, and W.P. Hanage.** 2013. Comparative genomics of recent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: short-term evolution of an emerging pathogen. *MBio*, **4**(1): p. e00452-12.

102. **Grauke L.J., I.T. Kudva, J.W. Yoon, C.W. Hunt, C.J. Williams, and C.J. Hovde.** 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol*, **68**(5): p. 2269-77.
103. **Greinacher A., S. Friesecke, P. Abel, A. Dressel, S. Stracke, M. Fiene, F. Ernst, K. Selleng, K. Weissenborn, B.M. Schmidt, M. Schiffer, S.B. Felix, M.M. Lerch, J.T. Kielstein, and J. Mayerle.** 2011. Treatment of severe neurological deficits with IgG depletion through immunoabsorption in patients with *Escherichia coli* O104:H4-associated haemolytic uraemic syndrome: a prospective trial. *Lancet*, **378**(9797): p. 1166-73.
104. **Griffin P.M., L.C. Olmstead, and R.E. Petras.** 1990. *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology*, **99**(1): p. 142-9.
105. **Griffin P.M. and 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**: p. 60-98.
106. **Grimm V., S. Ezaki, M. Susa, C. Knabbe, R.D. Schmid, and T.T. Bachmann.** 2004. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(8): p. 3766-74.
107. **Gunning R.F., A.D. Wales, G.R. Pearson, E. Done, A.L. Cookson, and M.J. Woodward.** 2001. Attaching and effacing lesions in the intestines of two calves associated with natural infection with *Escherichia coli* O26:H11. *Vet Rec*, **148**(25): p. 780-2.
108. **Gyles C.L.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci*, **85**(13 Suppl): p. E45-62.
109. **Hancock D.D., T.E. Besser, M.L. Kinsel, P.I. Tarr, D.H. Rice, and M.G. Paros.** 1994. The prevalence of *Escherichia coli* O157.H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect*, **113**(2): p. 199-207.
110. **Hancock D.D., T.E. Besser, D.H. Rice, D.E. Herriott, and P.I. Tarr.** 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect*, **118**(2): p. 193-5.
111. **Harmon B.G., C.A. Brown, S. Tkalcic, P.O. Mueller, A. Parks, A.V. Jain, T. Zhao, and M.P. Doyle.** 1999. Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J Food Prot*, **62**(6): p. 574-9.
112. **Harrington S.M., M.C. Strauman, C.M. Abe, and J.P. Nataro.** 2005. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, **7**(11): p. 1565-78.
113. **Harrington S.M., J. Sheikh, I.R. Henderson, F. Ruiz-Perez, P.S. Cohen, and J.P. Nataro.** 2009. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. *Infect Immun*, **77**(6): p. 2465-73.
114. **Hebbelstrup Jensen B., K.E. Olsen, C. Struve, K.A. Krogfelt, and A.M. Petersen.** 2014. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, **27**(3): p. 614-30.
115. **Hicks S., D.C. Candy, and A.D. Phillips.** 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun*, **64**(11): p. 4751-60.
116. **Hoey D.E., C. Currie, R.W. Else, A. Nutikka, C.A. Lingwood, D.L. Gally, and D.G. Smith.** 2002. Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *Journal of Medical Microbiology*, **51**(2): p. 143-9.

117. **Hoey D.E., L. Sharp, C. Currie, C.A. Lingwood, D.L. Gally, and D.G. Smith.** 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cell Microbiol*, **5**(2): p. 85-97.
118. **Hoffman M.A., C. Menge, T.A. Casey, W. Laegreid, B.T. Bosworth, and E.A. Dean-Nystrom.** 2006. Bovine immune response to Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 : H7. *Clinical and Vaccine Immunology*, **13**(12): p. 1322-1327.
119. **Holgersson J., P.A. Jovall, and M.E. Breimer.** 1991. Glycosphingolipids of human large intestine: detailed structural characterization with special reference to blood group compounds and bacterial receptor structures. *J Biochem*, **110**(1): p. 120-31.
120. **Holland R.E., R.A. Wilson, M.S. Holland, V. Yuzbasiyan-Gurkan, T.P. Mullaney, and D.G. White.** 1999. Characterization of *eae+* *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. *Vet Microbiol*, **66**(4): p. 251-63.
121. **Hornitzky M.A., K. Mercieca, K.A. Bettelheim, and S.P. Djordjevic.** 2005. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. *Appl Environ Microbiol*, **71**(7): p. 3405-12.
122. **Hovde C.J., P.R. Austin, K.A. Cloud, C.J. Williams, and C.W. Hunt.** 1999. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Appl Environ Microbiol*, **65**(7): p. 3233-5.
123. **Hristov A.N., S. Ahvenjarvi, T.A. McAllister, and P. Huhtanen.** 2003. Composition and digestive tract retention time of ruminal particles with functional specific gravity greater or less than 1.02. *J Anim Sci*, **81**(10): p. 2639-48.
124. **Huang D.B., A. Mohanty, H.L. DuPont, P.C. Okhuysen, and T. Chiang.** 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, **55**(Pt 10): p. 1303-11.
125. **Hughes A.K., P.K. Stricklett, D. Schmid, and D.E. Kohan.** 2000. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells. *Kidney Int*, **57**(6): p. 2350-9.
126. **Hurley B.P., M. Jacewicz, C.M. Thorpe, L.L. Lincicome, A.J. King, G.T. Keusch, and D.W. Acheson.** 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, **67**(12): p. 6670-7.
127. **Hurley B.P., C.M. Thorpe, and D.W. Acheson.** 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun*, **69**(10): p. 6148-55.
128. **Ikeda K., O. Ida, K. Kimoto, T. Takatorige, N. Nakanishi, and K. Tatara.** 1999. Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clin Nephrol*, **52**(6): p. 357-62.
129. **Ismaili A., D.J. Philpott, M.T. Dytoc, and P.M. Sherman.** 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **63**(9): p. 3316-26.
130. **Jacewicz M.S., D.W. Acheson, D.G. Binion, G.A. West, L.L. Lincicome, C. Fiocchi, and G.T. Keusch.** 1999. Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infect Immun*, **67**(3): p. 1439-44.
131. **Jansen A. and J.T. Kielstein.** 2011. The new face of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Euro Surveill*, **16**(25).
132. **Jarvis K.G. and J.B. Kaper.** 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun*, **64**(11): p. 4826-9.
133. **Jensen V.B., J.T. Harty, and B.D. Jones.** 1998. Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect Immun*, **66**(8): p. 3758-66.

134. **Jentsch W., H. Wittenburg, and M. Beyer.** 1992. [Effect of the starch sources barley, corn, potatoes and their ration fractions on the nutrient digestibility and energy utilization in ruminants. 1. Comparative studies of nutrient digestibility in cattle and sheep]. *Arch Tierernahr*, **42**(3-4): p. 301-16.
135. **Jiang Z.D., D. Greenberg, J.P. Nataro, R. Steffen, and H.L. DuPont.** 2002. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J Clin Microbiol*, **40**(11): p. 4185-90.
136. **Johnson J.R., K. Owens, A. Gajewski, and C. Clabots.** 2008. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *J Infect Dis*, **197**(2): p. 218-24.
137. **Johnson R.P., W.C. Cray, Jr., and S.T. Johnson.** 1996. Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, **64**(5): p. 1879-83.
138. **Johnson W.M., H. Lior, and G.S. Bezanson.** 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet*, **1**(8314-5): p. 76.
139. **Jonsson M.E., A. Aspan, E. Eriksson, and I. Vagsholm.** 2001. Persistence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during the summer months in a Swedish dairy herd. *Int J Food Microbiol*, **66**(1-2): p. 55-61.
140. **Jonsson M.E., E. Eriksson, S. Boqvist, A.M. Urdahl, and A. Aspan.** 2009. Experimental infection in calves with a specific subtype of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *Acta Vet Scand*, **51**: p. 43.
141. **Kado C.I. and S.T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, **145**(3): p. 1365-73.
142. **Kagambega A., O. Martikainen, T. Lienemann, A. Siitonen, A.S. Traore, N. Barro, and K. Haukka.** 2012. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local markets in Ouagadougou, Burkina Faso. *Int J Food Microbiol*, **153**(1-2): p. 154-8.
143. **Kandel G., A. Donohue-Rolfe, M. Donowitz, and G.T. Keusch.** 1989. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XVI. Selective targetting of Shiga toxin to villus cells of rabbit jejunum explains the effect of the toxin on intestinal electrolyte transport. *J Clin Invest*, **84**(5): p. 1509-17.
144. **Kaper J.B.** 1998. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*. *Jpn J Med Sci Biol*, **51** Suppl: p. S101-7.
145. **Kaper J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, **2**(2): p. 123-40.
146. **Karch H., H. Russmann, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, and J. Heesemann.** 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol*, **33**(6): p. 1602-5.
147. **Karch H.** 2001. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)--associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost*, **27**(3): p. 207-13.
148. **Karch H., P.I. Tarr, and M. Bielaszewska.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol*, **295**(6-7): p. 405-18.
149. **Karch H., A.W. Friedrich, A. Gerber, L.B. Zimmerhackl, M.A. Schmidt, and M. Bielaszewska.** 2006. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost*, **32**(2): p. 105-12.
150. **Karch H.** 2011. Laborinformationen zum EHEC Ausbruchsstamm.
151. **Karch H., E. Denamur, U. Dobrindt, B.B. Finlay, R. Hengge, L. Johannes, E.Z. Ron, T. Tonjum, P.J. Sansonetti, and M. Vicente.** 2012. The enemy within us:

- lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med*, **4**(9): p. 841-8.
152. **Karmali M.A., B.T. Steele, M. Petric, and C. Lim.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, **1**(8325): p. 619-20.
153. **Katagiri Y.U., T. Mori, H. Nakajima, C. Katagiri, T. Taguchi, T. Takeda, N. Kiyokawa, and J. Fujimoto.** 1999. Activation of Src family kinase yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *J Biol Chem*, **274**(49): p. 35278-82.
154. **Keenan K.P., D.D. Sharpnack, H. Collins, S.B. Formal, and A.D. O'Brien.** 1986. Morphologic evaluation of the effects of Shiga toxin and E coli Shiga-like toxin on the rabbit intestine. *Am J Pathol*, **125**(1): p. 69-80.
155. **Kerner K.** 2012. In vitro-Evaluation von rekombinanten *E. coli* Shigatoxoiden als Impfstoffkandidaten für Rinder. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen
156. **Kieckens E., J. Rybarczyk, L. De Zutter, L. Duchateau, D. Vanrompay, and E. Cox.** 2014. Clearance of *Escherichia coli* O157:H7 infection in calves by rectal administration of bovine lactoferrin. *Appl Environ Microbiol*.
157. **Knutton S., T. Baldwin, P.H. Williams, and A.S. McNeish.** 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **57**(4): p. 1290-8.
158. **Knutton S., R.K. Shaw, M.K. Bhan, H.R. Smith, M.M. McConnell, T. Cheasty, P.H. Williams, and T.J. Baldwin.** 1992. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. *Infect Immun*, **60**(5): p. 2083-91.
159. **Konowalchuk J., J.I. Speirs, and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **18**(3): p. 775-9.
160. **Kudva I.T., P.G. Hatfield, and C.J. Hovde.** 1995. Effect of diet on the shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in a sheep model. *Appl Environ Microbiol*, **61**(4): p. 1363-70.
161. **Kudva I.T., C.W. Hunt, C.J. Williams, U.M. Nance, and C.J. Hovde.** 1997. Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Appl Environ Microbiol*, **63**(10): p. 3878-86.
162. **Kudva I.T. and E.A. Dean-Nystrom.** 2011. Bovine recto-anal junction squamous epithelial (RSE) cell adhesion assay for studying *Escherichia coli* O157 adherence. *J Appl Microbiol*, **111**(5): p. 1283-94.
163. **Kudva I.T., R.W. Griffin, B. Krastins, D.A. Sarracino, S.B. Calderwood, and M. John.** 2012. Proteins other than the locus of enterocyte effacement-encoded proteins contribute to *Escherichia coli* O157:H7 adherence to bovine rectoanal junction stratified squamous epithelial cells. *BMC Microbiol*, **12**: p. 103.
164. **Kudva I.T., C.J. Hovde, and M. John.** 2013. Adherence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to bovine recto-anal junction squamous epithelial cells appears to be mediated by mechanisms distinct from those used by O157. *Foodborne Pathog Dis*, **10**(4): p. 375-81.
165. **Kudva I.T., B. Krastins, A.G. Torres, R.W. Griffin, H. Sheng, D.A. Sarracino, C.J. Hovde, S.B. Calderwood, and M. John.** 2015. The *Escherichia coli* O157:H7 cattle immunoproteome includes outer membrane protein A (OmpA), a modulator of adherence to bovine rectoanal junction squamous epithelial (RSE) cells. *Proteomics*, **15**(11): p. 1829-42.

166. **La Ragione R.M., N.M. Ahmed, A. Best, D. Clifford, U. Weyer, W.A. Cooley, L. Johnson, G.R. Pearson, and M.J. Woodward.** 2005. Colonization of 8-week-old conventionally reared goats by *Escherichia coli* O157 : H7 after oral inoculation. *Journal of Medical Microbiology*, **54**(Pt 5): p. 485-92.
167. **Lapeyraque A.L., M. Malina, V. Fremeaux-Bacchi, T. Boppel, M. Kirschfink, M. Oualha, F. Proulx, M.J. Clermont, F. Le Deist, P. Niaudet, and F. Schaefer.** 2011. Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med*, **364**(26): p. 2561-3.
168. **Lee J.H. and B.D. Stein.** 2009. Antimicrobials effective for inhibition of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains O26, O111, and O157 and their effects on Shiga toxin releases. *J Microbiol Biotechnol*, **19**(10): p. 1238-43.
169. **Leflon-Guibout V., C. Jurand, S. Bonacorsi, F. Espinasse, M.C. Guelfi, F. Duportail, B. Heym, E. Bingen, and M.H. Nicolas-Chanoine.** 2004. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**(10): p. 3736-42.
170. **Leung P.H., J.S. Peiris, W.W. Ng, R.M. Robins-Browne, K.A. Bettelheim, and W.C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, **69**(12): p. 7549-53.
171. **Licence K., K.R. Oates, B.A. Syngé, and T.M. Reid.** 2001. An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol Infect*, **126**(1): p. 135-8.
172. **Lim J.Y., J. Li, H. Sheng, T.E. Besser, K. Potter, and C.J. Hovde.** 2007. *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Appl Environ Microbiol*, **73**(4): p. 1380-2.
173. **Lin J., M.P. Smith, K.C. Chapin, H.S. Baik, G.N. Bennett, and J.W. Foster.** 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, **62**(9): p. 3094-100.
174. **Lingwood C.A.** 1999. Glycolipid receptors for verotoxin and *Helicobacter pylori*: role in pathology. *Biochim Biophys Acta*, **1455**(2-3): p. 375-86.
175. **Louie M., S. Read, L. Louie, K. Ziebell, K. Rahn, A. Borczyk, and H. Lior.** 1999. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol Infect*, **123**(1): p. 17-24.
176. **Louise C.B. and T.G. Obrig.** 1994. Human renal microvascular endothelial cells as a potential target in the development of the hemolytic uremic syndrome as related to fibrinolysis factor expression, in vitro. *Microvasc Res*, **47**(3): p. 377-87.
177. **Magnuson B.A., M. Davis, S. Hubele, P.R. Austin, I.T. Kudva, C.J. Williams, C.W. Hunt, and C.J. Hovde.** 2000. Ruminant gastrointestinal cell proliferation and clearance of *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, **68**(7): p. 3808-14.
178. **Martin A. and L. Beutin.** 2011. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *Int J Food Microbiol*, **146**(1): p. 99-104.
179. **Mathewson J.J., P.C. Johnson, H.L. DuPont, D.R. Morgan, S.A. Thornton, L.V. Wood, and C.D. Ericsson.** 1985. A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, **151**(3): p. 471-5.
180. **Mathewson J.J., P.C. Johnson, H.L. DuPont, T.K. Satterwhite, and D.K. Winsor.** 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J Infect Dis*, **154**(3): p. 524-7.
181. **McDaniel T.K., K.G. Jarvis, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(5): p. 1664-8.

182. **McKee M.L. and A.D. O'Brien.** 1995. Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infect Immun*, **63**(5): p. 2070-4.
183. **Mellmann A., M. Bielaszewska, R. Kock, A.W. Friedrich, A. Fruth, B. Middendorf, D. Harmsen, M.A. Schmidt, and H. Karch.** 2008. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, **14**(8): p. 1287-90.
184. **Mellmann A., D. Harmsen, C.A. Cummings, E.B. Zentz, S.R. Leopold, A. Rico, K. Prior, R. Szczepanowski, Y. Ji, W. Zhang, S.F. McLaughlin, J.K. Henkhaus, B. Leopold, M. Bielaszewska, R. Prager, P.M. Brzoska, R.L. Moore, S. Guenther, J.M. Rothberg, and H. Karch.** 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*, **6**(7): p. e22751.
185. **Melton-Celsa A.R., J.E. Rogers, C.K. Schmitt, S.C. Darnell, and A.D. O'Brien.** 1998. Virulence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the type of toxin produced by the infecting strain. *Jpn J Med Sci Biol*, **51** Suppl: p. S108-14.
186. **Menard L.P. and J.D. Dubreuil.** 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol*, **28**(1): p. 43-60.
187. **Menge C.** 2006. Immunmodulatorische Wirkung und pathogenetische Bedeutung der *Escherichia coli* Shigatoxine beim Rind. Habilitationsschrift. Justus-Liebig-Universität, Gießen
188. **Menge C. and E.A. Dean-Nystrom.** 2008. Dexamethasone depletes gammadelta T cells and alters the activation state and responsiveness of bovine peripheral blood lymphocyte subpopulations. *J Dairy Sci*, **91**(6): p. 2284-98.
189. **Miliwebsky E., N. Deza, I. Chinen, E. Martinez Espinosa, D. Gomez, E. Pedroni, L. Caprile, A. Bashckier, E. Manfredi, G. Leotta, and M. Rivas.** 2007. Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. *Rev Argent Microbiol*, **39**(2): p. 90-2.
190. **Miyamoto Y., M. Iimura, J.B. Kaper, A.G. Torres, and M.F. Kagnoff.** 2006. Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. *Cell Microbiol*, **8**(5): p. 869-79.
191. **Moake J.L.** 1994. Haemolytic-uraemic syndrome: basic science. *Lancet*, **343**(8894): p. 393-7.
192. **Mohamed J.A., H.L. DuPont, J. Flores, H. Palur, P. Nair, Z.D. Jiang, D. Guo, J. Belkind-Gerson, and P.C. Okhuysen.** 2011. Single nucleotide polymorphisms in the promoter of the gene encoding the lipopolysaccharide receptor CD14 are associated with bacterial diarrhea in US and Canadian travelers to Mexico. *Clin Infect Dis*, **52**(11): p. 1332-41.
193. **Mohr M.** 2007. Nachweis und Reaktivität epithelialer und mesenchymaler Zielzellen für *Escherichia coli* Shigatoxin in den Kolonkrypten des Rindes. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen
194. **Mohsin M., S. Guenther, P. Schierack, K. Tedin, and L.H. Wieler.** 2015. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces growth, Shiga toxin expression, release and thus cytotoxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, **305**(1): p. 20-6.
195. **Monecke S., P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen, F.X. Weill, C. Baliere, P. Slickers, and R. Ehricht.** 2011. Presence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* ST678/O104:H4 in France prior to 2011. *Appl Environ Microbiol*, **77**(24): p. 8784-6.

196. **Monteiro-Neto V., S.Y. Bando, C.A. Moreira-Filho, and J.A. Giron.** 2003. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell Microbiol*, **5**(8): p. 533-47.
197. **Morabito S., H. Karch, P. Mariani-Kurkdjian, H. Schmidt, F. Minelli, E. Bingen, and A. Caprioli.** 1998. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(3): p. 840-2.
198. **Morgan G.M., C. Newman, S.R. Palmer, J.B. Allen, W. Shepherd, A.M. Rampling, R.E. Warren, R.J. Gross, S.M. Scotland, and H.R. Smith.** 1988. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O 157.H7 in the UK. *Epidemiol Infect*, **101**(1): p. 83-91.
199. **Moriarty E.M., M.L. Mackenzie, N. Karki, and L.W. Sinton.** 2011. Survival of *Escherichia coli*, Enterococci, and *Campylobacter* spp. in sheep feces on pastures. *Appl Environ Microbiol*, **77**(5): p. 1797-803.
200. **Mossoro C., P. Glaziou, S. Yassibanda, N.T. Lan, C. Bekondi, P. Minssart, C. Bernier, C. Le Bouguenec, and Y. Germani.** 2002. Chronic diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic-uremic syndrome associated with HEP-2 adherent *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus in Bangui, Central African Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(8): p. 3086-8.
201. **Moxley R.A. and D.H. Francis.** 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun*, **53**(2): p. 339-46.
202. **Muller D., L. Greune, G. Heusipp, H. Karch, A. Fruth, H. Tschape, and M.A. Schmidt.** 2007. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*, **73**(10): p. 3380-90.
203. **Munera D., J.M. Ritchie, S.K. Hatzios, R. Bronson, G. Fang, E.E. Schadt, B.M. Davis, and M.K. Waldor.** 2014. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. *Nat Commun*, **5**: p. 3080.
204. **Nataro J.** Enteroaggregative *Escherichia coli*, in *Emerging infections 6*, W.M. Scheld, B.E. Murray, and J.M.e. Hughes, Editors. 2004, ASM Press: Washington, DC. p. 101-110.
205. **Nataro J.P., I.C. Scaletsky, J.B. Kaper, M.M. Levine, and L.R. Trabulsi.** 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **48**(2): p. 378-83.
206. **Nataro J.P., J.B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. Vial, and M.M. Levine.** 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Pediatr Infect Dis J*, **6**(9): p. 829-31.
207. **Nataro J.P., D. Yikang, J.A. Giron, S.J. Savarino, M.H. Kothary, and R. Hall.** 1993. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect Immun*, **61**(3): p. 1126-31.
208. **Nataro J.P., Y. Deng, S. Cookson, A. Cravioto, S.J. Savarino, L.D. Guers, M.M. Levine, and C.O. Tacket.** 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *Journal of Infectious Diseases*, **171**(2): p. 465-8.
209. **Nataro J.P., S. Hicks, A.D. Phillips, P.A. Vial, and C.L. Sears.** 1996. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun*, **64**(11): p. 4761-8.
210. **Nataro J.P. and J.B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, **11**(1): p. 142-201.

211. **Nataro J.P.** 2005. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*, **21**(1): p. 4-8.
212. **Navarro-Garcia F., A. Canizalez-Roman, J. Luna, C. Sears, and J.P. Nataro.** 2001. Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. *Infect Immun*, **69**(2): p. 1053-60.
213. **Navarro A., D. Licon, L.A. León, G. Peérez, M.C. Ariza, A. Gutiérrez, A. Trejo, M. Díaz, S.P. Díaz, J.D. Meza, A. Cravioto, and C. Eslava.** *Escherichia coli* O104 isolation frequency and immune response against O104 LPS in dairy cattle from different States of Mexico in *VTEC 2012 International Conference 2012*. Amsterdam.
214. **Naylor S.W., J.C. Low, T.E. Besser, A. Mahajan, G.J. Gunn, M.C. Pearce, I.J. McKendrick, D.G. Smith, and D.L. Gally.** 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun*, **71**(3): p. 1505-12.
215. **Naylor S.W., D.L. Gally, and J.C. Low.** 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*, **295**(6-7): p. 419-41.
216. **Naylor S.W., A.J. Roe, P. Nart, K. Spears, D.G. Smith, J.C. Low, and D.L. Gally.** 2005. *Escherichia coli* O157 : H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. *Microbiology*, **151**(Pt 8): p. 2773-81.
217. **Naylor S.W., A. Flockhart, P. Nart, D.G. Smith, J. Huntley, D.L. Gally, and J.C. Low.** 2007. Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves is reduced by prior colonization with the homologous strain. *Appl Environ Microbiol*, **73**(11): p. 3765-7.
218. **Nicholls L., T.H. Grant, and R.M. Robins-Browne.** 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol*, **35**(2): p. 275-88.
219. **Nitschke M., F. Sayk, C. Hartel, R.T. Roseland, S. Hauswaldt, J. Steinhoff, K. Fellermann, I. Derad, P. Wellhoner, J. Buning, B. Tiemer, A. Katalinic, J. Rupp, H. Lehnert, W. Solbach, and J.K. Knobloch.** 2012. Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA*, **307**(10): p. 1046-52.
220. **O'Brien A.D. and G.D. LaVeck.** 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **40**(2): p. 675-83.
221. **O'Brien A.O., T.A. Lively, M.E. Chen, S.W. Rothman, and S.B. Formal.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet*, **1**(8326 Pt 1): p. 702.
222. **Oelschlaeger T.A., T.J. Barrett, and D.J. Kopecko.** 1994. Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Infect Immun*, **62**(11): p. 5142-50.
223. **Ohya T. and H. Ito.** 1999. Experimental infection of calves with *Escherichia coli* O157:H7. *J Vet Med Sci*, **61**(10): p. 1187-9.
224. **Ohya T., T. Marubashi, and H. Ito.** 2000. Significance of fecal volatile fatty acids in shedding of *Escherichia coli* O157 from calves: experimental infection and preliminary use of a probiotic product. *J Vet Med Sci*, **62**(11): p. 1151-5.
225. **Okeke I.N., A. Lamikanra, J. Czczulin, F. Dubovsky, J.B. Kaper, and J.P. Nataro.** 2000. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. *J Infect Dis*, **181**(1): p. 252-60.

226. **Orr P., D. Milley, D. Colby, and M. Fost.** 1994. Prolonged fecal excretion of verotoxin-producing *Escherichia coli* following diarrheal illness. *Clin Infect Dis*, **19**(4): p. 796-7.
227. **Orskov F., I. Orskov, and J.A. Villar.** 1987. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, **2**(8553): p. 276.
228. **Paddock Z.D., J. Bai, X. Shi, D.G. Renter, and T.G. Nagaraja.** 2013. Detection of *Escherichia coli* O104 in the feces of feedlot cattle by a multiplex PCR assay designed to target major genetic traits of the virulent hybrid strain responsible for the 2011 German outbreak. *Appl Environ Microbiol*, **79**(11): p. 3522-5.
229. **Paterson D.L., K.M. Hujer, A.M. Hujer, B. Yeiser, M.D. Bonomo, L.B. Rice, R.A. Bonomo, and the International Klebsiella Study Group.** 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**(11): p. 3554-60.
230. **Paton A.W. and J.C. Paton.** 1998. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb<sub>O111</sub>*, and *rfb<sub>O157</sub>*. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(2): p. 598-602.
231. **Persson S., K.E. Olsen, S. Ethelberg, and F. Scheutz.** 2007. Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol*, **45**(6): p. 2020-4.
232. **Phillips A.D. and G. Frankel.** 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis*, **181**(4): p. 1496-500.
233. **Phillips A.D., S. Navabpour, S. Hicks, G. Dougan, T. Wallis, and G. Frankel.** 2000. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut*, **47**(3): p. 377-81.
234. **Pierard D., H. De Greve, F. Haesebrouck, and J. Mainil.** 2012. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Vet Res*, **43**(1): p. 13.
235. **Pirro F., L.H. Wieler, K. Failing, R. Bauerfeind, and G. Baljer.** 1995. Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle. *Veterinary Microbiology*, **43**(2-3): p. 131-41.
236. **Pohlentz J.F. and E.A. Dean-Nystrom.** 2004. Colonisation of *Escherichia coli* O157:H7 on squamous epithelial cells at the rectal-anal junction. *Vet Rec*, **155**(8): p. 248.
237. **Prager R., C. Lang, P. Aurass, A. Fruth, E. Tietze, and A. Flieger.** 2014. Two novel EHEC/EAEC hybrid strains isolated from human infections. *Plos One*, **9**(4): p. e95379.
238. **Proulx F., E.G. Seidman, and D. Karpman.** 2001. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Research*, **50**(2): p. 163-71.
239. **Pruimboom-Brees I.M., T.W. Morgan, M.R. Ackermann, E.D. Nystrom, J.E. Samuel, N.A. Cornick, and H.W. Moon.** 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(19): p. 10325-9.
240. **Puno-Sarmiento J., L. Medeiros, C. Chiconi, F. Martins, J. Pelayo, S. Rocha, J. Blanco, M. Blanco, M. Zanutto, R. Kobayashi, and G. Nakazato.** 2013. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Vet Microbiol*, **166**(3-4): p. 676-80.

241. **Rajakumar K., C. Sasakawa, and B. Adler.** 1997. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect Immun*, **65**(11): p. 4606-14.
242. **Ramegowda B., J.E. Samuel, and V.L. Tesh.** 1999. Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents. *J Infect Dis*, **180**(4): p. 1205-13.
243. **Rasko D.A., D.R. Webster, J.W. Sahl, A. Bashir, N. Boisen, F. Scheutz, E.E. Paxinos, R. Sebra, C.S. Chin, D. Iliopoulos, A. Klammer, P. Peluso, L. Lee, A.O. Kislyuk, J. Bullard, A. Kasarskis, S. Wang, J. Eid, D. Rank, J.C. Redman, S.R. Steyert, J. Frimodt-Moller, C. Struve, A.M. Petersen, K.A. Kroghfelt, J.P. Nataro, E.E. Schadt, and M.K. Waldor.** 2011. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med*, **365**(8): p. 709-17.
244. **Rasmussen M.A., W.C. Cray, Jr., T.A. Casey, and S.C. Whipp.** 1993. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters*, **114**(1): p. 79-84.
245. **Riley L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, **308**(12): p. 681-5.
246. **Robert-Koch-Institut (Hrsg.).** 2011. Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch. <https://www.rki.de/>
247. **Robert-Koch-Institut (Hrsg.).** 2011. Eigenschaften des Erregers sowie Hinweise und Hilfestellungen des RKI zur Diagnostik des gegenwärtig zirkulierenden Ausbruchstammes. <https://www.rki.de/>
248. **Robert-Koch-Institut (Hrsg.).** 2014. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. <https://www.rki.de/>
249. **Rowe P.C., E. Orrbine, M. Ogborn, G.A. Wells, W. Winther, H. Lior, D. Manuel, and P.N. McLaine.** 1994. Epidemic *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and hemolytic-uremic syndrome in a Canadian inuit community: intestinal illness in family members as a risk factor. *J Pediatr*, **124**(1): p. 21-6.
250. **Rund S.A., H. Rohde, U. Sonnenborn, and T.A. Oelschlaeger.** 2013. Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. *Int J Med Microbiol*, **303**(1): p. 1-8.
251. **Safadi R.A., G.S. Abu-Ali, R.E. Sloup, J.T. Rudrik, C.M. Waters, K.A. Eaton, and S.D. Manning.** 2012. Correlation between In Vivo Biofilm Formation and Virulence Gene Expression in *Escherichia coli* O104:H4. *Plos One*, **7**(7): p. e41628.
252. **Salomon F.V., H. Geyer, U. Gille, H. Cerny, A. Schulze, and P. Simoens.** 2005. *Anatomie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke Verlag. 3-8304-1007-7.
253. **Sanderson M.W., T.E. Besser, J.M. Gay, C.C. Gay, and D.D. Hancock.** 1999. Fecal *Escherichia coli* O157:H7 shedding patterns of orally inoculated calves. *Veterinary Microbiology*, **69**(3): p. 199-205.
254. **Sarantuya J., J. Nishi, N. Wakimoto, S. Erdene, J.P. Nataro, J. Sheikh, M. Iwashita, K. Manago, K. Tokuda, M. Yoshinaga, K. Miyata, and Y. Kawano.** 2004. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J Clin Microbiol*, **42**(1): p. 133-9.
255. **Savarino S.J., A. Fasano, D.C. Robertson, and M.M. Levine.** 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin Invest*, **87**(4): p. 1450-5.

256. **Savarino S.J., A. McVeigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M.K. Bhan, M.M. Levine, and A. Fasano.** 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis*, **173**(4): p. 1019-22.
257. **Scaletsky I.C., M.L. Silva, and L.R. Trabulsi.** 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun*, **45**(2): p. 534-6.
258. **Scheutz F., E.M. Nielsen, J. Frimodt-Moller, N. Boisen, S. Morabito, R. Tozzoli, J.P. Nataro, and A. Caprioli.** 2011. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill*, **16**(24).
259. **Scheutz F., L.D. Teel, L. Beutin, D. Pierard, G. Buvens, H. Karch, A. Mellmann, A. Caprioli, R. Tozzoli, S. Morabito, N.A. Strockbine, A.R. Melton-Celsa, M. Sanchez, S. Persson, and A.D. O'Brien.** 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**(9): p. 2951-63.
260. **Schmidt H., L. Beutin, and H. Karch.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun*, **63**(3): p. 1055-61.
261. **Schmidt H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L.H. Wieler, and H. Karch.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol*, **66**(3): p. 1205-8.
262. **Schmidt H.** 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol*, **152**(8): p. 687-95.
263. **Schmitt C.K., M.L. McKee, and A.D. O'Brien.** 1991. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun*, **59**(3): p. 1065-73.
264. **Schoonderwoerd M., R.C. Clarke, A.A. van Dreumel, and S.A. Rawluk.** 1988. Colitis in calves: natural and experimental infection with a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O111:NM. *Can J Vet Res*, **52**(4): p. 484-7.
265. **Schuller S., G. Frankel, and A.D. Phillips.** 2004. Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol*, **6**(3): p. 289-301.
266. **Schuller S., R. Heuschkel, F. Torrente, J.B. Kaper, and A.D. Phillips.** 2007. Shiga toxin binding in normal and inflamed human intestinal mucosa. *Microbes Infect*, **9**(1): p. 35-9.
267. **Scotland S.M., H.R. Smith, and B. Rowe.** 1985. Two Distinct Toxins Active on Vero Cells from *Escherichia coli* 0157. *The Lancet*, **326**(8460): p. 885-886.
268. **Shaw D.J., C. Jenkins, M.C. Pearce, T. Cheasty, G.J. Gunn, G. Dougan, H.R. Smith, M.E. Woolhouse, and G. Frankel.** 2004. Shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm. *Appl Environ Microbiol*, **70**(12): p. 7456-65.
269. **Sheikh J., S. Hicks, M. Dall'Agnol, A.D. Phillips, and J.P. Nataro.** 2001. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **41**(5): p. 983-97.
270. **Sheikh J., J.R. Czczulin, S. Harrington, S. Hicks, I.R. Henderson, C. Le Bouguenec, P. Gounon, A. Phillips, and J.P. Nataro.** 2002. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, **110**(9): p. 1329-37.

271. **Sheng H., M.A. Davis, H.J. Knecht, and C.J. Hovde.** 2004. Rectal administration of *Escherichia coli* O157:H7: novel model for colonization of ruminants. *Appl Environ Microbiol*, **70**(8): p. 4588-95.
272. **Sheng H., J.Y. Lim, H.J. Knecht, J. Li, and C.J. Hovde.** 2006. Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infect Immun*, **74**(8): p. 4685-93.
273. **Shimizu T., Y. Ohta, H. Tsutsuki, and M. Noda.** 2011. Construction of a novel bioluminescent reporter system for investigating Shiga toxin expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gene*, **478**(1-2): p. 1-10.
274. **Shin R., M. Suzuki, and Y. Morishita.** 2002. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Med Microbiol*, **51**(3): p. 201-6.
275. **Sidhu J.P., W. Ahmed, L. Hodgers, and S. Toze.** 2013. Occurrence of virulence genes associated with Diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. *Appl Environ Microbiol*, **79**(1): p. 328-35.
276. **Sinclair J.F. and A.D. O'Brien.** 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem*, **277**(4): p. 2876-85.
277. **Sinton L.W., R.R. Braithwaite, C.H. Hall, and M.L. Mackenzie.** 2007. Survival of indicator and pathogenic bacteria in bovine feces on pasture. *Appl Environ Microbiol*, **73**(24): p. 7917-25.
278. **Smet A., F. Van Nieuwerburgh, T.T. Vandekerckhove, A. Martel, D. Deforce, P. Butaye, and F. Haesebrouck.** 2010. Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PLoS One*, **5**(6): p. e11202.
279. **Smith H.R., S.M. Scotland, G.A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava.** 1994. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. *J Infect Dis*, **170**(6): p. 1610-3.
280. **Stamm I., M. Mohr, P.S. Bridger, E. Schropfer, M. Konig, W.C. Stoffregen, E.A. Dean-Nystrom, G. Baljer, and C. Menge.** 2008. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Infect Immun*, **76**(11): p. 5381-91.
281. **Steiner T.S., J.P. Nataro, C.E. Poteet-Smith, J.A. Smith, and R.L. Guerrant.** 2000. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, **105**(12): p. 1769-77.
282. **Stevens M.P., O. Marches, J. Campbell, V. Huter, G. Frankel, A.D. Phillips, E. Oswald, and T.S. Wallis.** 2002. Intimin, tir, and shiga toxin 1 do not influence enteropathogenic responses to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine ligated intestinal loops. *Infect Immun*, **70**(2): p. 945-52.
283. **Stevens M.P., P.M. van Diemen, G. Frankel, A.D. Phillips, and T.S. Wallis.** 2002. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun*, **70**(9): p. 5158-66.
284. **Stevens M.P., A.J. Roe, I. Vlisidou, P.M. van Diemen, R.M. La Razione, A. Best, M.J. Woodward, D.L. Gally, and T.S. Wallis.** 2004. Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect Immun*, **72**(9): p. 5402-11.
285. **Stoffregen W.C., J.F. Pohlenz, and E.A. Dean-Nystrom.** 2004. *Escherichia coli* O157:H7 in the gallbladders of experimentally infected calves. *J Vet Diagn Invest*, **16**(1): p. 79-83.

286. **Strauman M.C., J.M. Harper, S.M. Harrington, E.J. Boll, and J.P. Nataro.** 2010. Enteroaggregative *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions. *Infect Immun*, **78**(11): p. 4958-64.
287. **Strockbine N.A., L.R. Marques, J.W. Newland, H.W. Smith, R.K. Holmes, and A.D. O'Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun*, **53**(1): p. 135-40.
288. **Tada H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama, and K. Tsukamoto.** 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*, **93**(2): p. 157-65.
289. **Taneike I., H.M. Zhang, N. Wakisaka-Saito, and T. Yamamoto.** 2002. Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Lett*, **524**(1-3): p. 219-24.
290. **Tarr P.I., M.A. Neill, C.R. Clausen, S.L. Watkins, D.L. Christie, and R.O. Hickman.** 1990. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis*, **162**(2): p. 553-6.
291. **Tarr P.I., S.S. Bilge, J.C. Vary, Jr., S. Jelacic, R.L. Habeeb, T.R. Ward, M.R. Baylor, and T.E. Besser.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun*, **68**(3): p. 1400-7.
292. **Tarr P.I. and M.A. Neill.** 2001. *Escherichia coli* O157:H7. *Gastroenterol Clin North Am*, **30**(3): p. 735-51.
293. **Taylor D.E., M. Rooker, M. Keelan, L.K. Ng, I. Martin, N.T. Perna, N.T. Burland, and F.R. Blattner.** 2002. Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Journal of Bacteriology*, **184**(17): p. 4690-8.
294. **te Loo D.M., L.A. Monnens, T.J. van Der Velden, M.A. Vermeer, F. Preyers, P.N. Demacker, L.P. van Den Heuvel, and V.W. van Hinsbergh.** 2000. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood*, **95**(11): p. 3396-402.
295. **Te Loo D.M., V.W. van Hinsbergh, L.P. van den Heuvel, and L.A. Monnens.** 2001. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, **12**(4): p. 800-6.
296. **Theurer C.B.** 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J Anim Sci*, **63**(5): p. 1649-62.
297. **Tilden J., Jr., W. Young, A.M. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M.A. Lambert-Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S.B. Werner, J. Hollingsworth, and J.G. Morris, Jr.** 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health*, **86**(8): p. 1142-5.
298. **Tkalcic S., C.A. Brown, B.G. Harmon, A.V. Jain, E.P. Mueller, A. Parks, K.L. Jacobsen, S.A. Martin, T. Zhao, and M.P. Doyle.** 2000. Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *J Food Prot*, **63**(12): p. 1630-6.
299. **Tran S.L., L. Billoud, S.B. Lewis, A.D. Phillips, and S. Schuller.** 2014. Shiga toxin production and translocation during microaerobic human colonic infection with Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 and O104:H4. *Cell Microbiol*, **16**(8): p. 1255-66.
300. **Tyler J.S., K. Beeri, J.L. Reynolds, C.J. Alteri, K.G. Skinner, J.H. Friedman, K.A. Eaton, and D.I. Friedman.** 2013. Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model. *PLoS Pathog*, **9**(3): p. e1003236.

301. **Tzipori S., J. Montanaro, R.M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M.M. Levine.** 1992. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect Immun*, **60**(12): p. 5302-6.
302. **Uber A.P., L.R. Trabulsi, K. Irino, L. Beutin, A.C. Ghilardi, T.A. Gomes, A.M. Liberatore, A.F. de Castro, and W.P. Elias.** 2006. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. *Fems Microbiology Letters*, **256**(2): p. 251-7.
303. **Ullrich S., P. Bremer, C. Neumann-Grutzeck, H. Otto, C. Ruther, C.U. von Seydewitz, G.P. Meyer, K. Ahmadi-Simab, J. Rother, B. Hogan, W. Schwenk, R. Fischbach, J. Caselitz, J. Puttfarcken, S. Huggett, P. Tiedeken, J. Pober, N.C. Kirkiles-Smith, and F. Hagenmuller.** 2013. Symptoms and clinical course of EHEC O104 infection in hospitalized patients: a prospective single center study. *PLoS One*, **8**(2): p. e55278.
304. **Van Baale M.J., J.M. Sargeant, D.P. Gnad, B.M. DeBey, K.F. Lechtenberg, and T.G. Nagaraja.** 2004. Effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *Appl Environ Microbiol*, **70**(9): p. 5336-42.
305. **van Diemen P.M., F. Dziva, M.P. Stevens, and T.S. Wallis.** 2005. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves. *Infect Immun*, **73**(3): p. 1735-43.
306. **Veilleux S. and J.D. Dubreuil.** 2006. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet Res*, **37**(1): p. 3-13.
307. **Velarde J.J., K.M. Varney, K.G. Inman, M. Farfan, E. Dudley, J. Fletcher, D.J. Weber, and J.P. Nataro.** 2007. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **66**(5): p. 1123-35.
308. **Vial P.A., R. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J.B. Kaper, J.P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M.M. Levine.** 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *Journal of Infectious Diseases*, **158**(1): p. 70-9.
309. **Von Moll L.K. and J.R. Cantey.** 1997. Peyer's patch adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains in rabbits. *Infect Immun*, **65**(9): p. 3788-93.
310. **Vonberg R.P., M. Hohle, M. Aepfelbacher, F.C. Bange, C. Belmar Campos, K. Claussen, M. Christner, J.P. Cramer, H. Haller, M. Hornef, H. Fickenscher, K. Fraedrich, J.K. Knobloch, T. Kuhbacher, M.P. Manns, M. Nitschke, G. Peters, M. Pulz, H. Rohde, R.T. Roseland, F. Sayk, F. Schaumburg, H.O. Schocklmann, S. Schubert, W. Solbach, H. Karch, and S. Suerbaum.** 2013. Duration of fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 in patients infected during the 2011 outbreak in Germany: a multicenter study. *Clin Infect Dis*, **56**(8): p. 1132-40.
311. **Wagner P.L., D.W. Acheson, and M.K. Waldor.** 2001. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **69**(3): p. 1934-7.
312. **Wagner P.L., M.N. Neely, X. Zhang, D.W. Acheson, M.K. Waldor, and D.I. Friedman.** 2001. Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol*, **183**(6): p. 2081-5.
313. **Wales A.D., G.R. Pearson, A.M. Skuse, J.M. Roe, C.M. Hayes, A.L. Cookson, and M.J. Woodward.** 2001. Attaching and effacing lesions caused by *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated neonatal lambs. *Journal of Medical Microbiology*, **50**(9): p. 752-8.
314. **Wales A.D., G.R. Pearson, J.M. Roe, C.M. Hayes, R.M. La Ragione, and M.J. Woodward.** 2005. Attaching-effacing lesions associated with *Escherichia coli*

- O157:H7 and other bacteria in experimentally infected conventional neonatal goats. *Journal of Comparative Pathology*, **132**(2-3): p. 185-94.
315. **Wanke C.A.** 1995. Enteropathogenic and enteroaggregative strains of *Escherichia coli*: clinical features of infection, epidemiology, and pathogenesis. *Curr Clin Top Infect Dis*, **15**: p. 230-52.
316. **Weber A., H. Klie, H. Richter, P. Gallien, M. Timm, and K.W. Perlberg.** 1997. [Present problems in detection of sources of infection and chains of infection with enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **110**(6): p. 211-3.
317. **Weinstein D.L., M.P. Jackson, J.E. Samuel, R.K. Holmes, and A.D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *Journal of Bacteriology*, **170**(9): p. 4223-30.
318. **Wells J.G., L.D. Shipman, K.D. Greene, E.G. Sowers, J.H. Green, D.N. Cameron, F.P. Downes, M.L. Martin, P.M. Griffin, S.M. Ostroff, 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**(5): p. 985-9.
319. **Wieler L.H., R. Bauerfeind, and G. Baljer.** 1992. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zentralbl Bakteriol*, **276**(2): p. 243-53.
320. **Wieler L.H., E. Vieler, C. Erpenstein, T. Schlapp, H. Steinruck, R. Bauerfeind, A. Byomi, and G. Baljer.** 1996. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J Clin Microbiol*, **34**(12): p. 2980-4.
321. **Wieler L.H., T. Semmler, I. Eichhorn, E.M. Antao, B. Kinnemann, L. Geue, H. Karch, S. Guenther, and A. Bethe.** 2011. No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area. *Gut Pathog*, **3**(1): p. 17.
322. **Wolin M.J.** 1969. Volatile fatty acids and the inhibition of *Escherichia coli* growth by rumen fluid. *Appl Microbiol*, **17**(1): p. 83-7.
323. **Wong C.S., S. Jelacic, R.L. Habeeb, S.L. Watkins, and P.I. Tarr.** 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med*, **342**(26): p. 1930-6.
324. **Yamamoto T. and P. Echeverria.** 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun*, **64**(4): p. 1441-5.
325. **Yatsuyanagi J., S. Saito, H. Sato, Y. Miyajima, K. Amano, and K. Enomoto.** 2002. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(1): p. 294-7.
326. **Zangari T., A.R. Melton-Celsa, A. Panda, N. Boisen, M.A. Smith, I. Tatarov, L.J. De Tolla, J.P. Nataro, and A.D. O'Brien.** 2013. Virulence of the Shiga toxin type 2-expressing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak isolate in two animal models. *Infect Immun*, **81**(5): p. 1562-74.
327. **Zhang W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, and H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx(Ic)*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*, **40**(4): p. 1441-6.
328. **Zhang W., M. Bielaszewska, L. Kunsmann, A. Mellmann, A. Bauwens, R. Kock, A. Kossow, A. Anders, S. Gatermann, and H. Karch.** 2013. Lability of the pAA Virulence Plasmid in O104:H4: Implications for Virulence in Humans. *Plos One*, **8**(6): p. e66717.

329. **Zhang X., A.D. McDaniel, L.E. Wolf, G.T. Keusch, M.K. Waldor, and D.W. Acheson.** 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, **181**(2): p. 664-70.
330. **Zhao T., M.P. Doyle, J. Shere, and L. Garber.** 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol*, **61**(4): p. 1290-3.
331. **Zhao T., M.P. Doyle, B.G. Harmon, C.A. Brown, P.O. Mueller, and A.H. Parks.** 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(3): p. 641-7.

## 11 Anhang

### 11.1 Datentabellen zu den Versuchstieren

**Tab. 22:** Übersicht über die Versuchstiere und Ergebnisse der Vortestung von Kotproben

Tier -nr.	Versuch	<i>E. coli</i> - Inokula- tionsstamm	Betrieb	Alter* [d]	Gewicht* [kg]	Untersuchung auf								
						<i>Yersinia</i> spp.	<i>Salm.</i> spp.	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Trichuris</i> spp.	Lungen- würmer	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>aggR</i>	
1	TV1A	123	A	111	110	-	-	++	-	X	-	-	-	-
2	TV1A	123	A	123	118	-	-	+	-	X	-	+	-	-
3	TV1A	123	A	134	168	-	-	+	+	X	-	+	-	-
4	TV1A	86-24 Nal	A	117	166	-	-	+	-	X	-	-	-	-
5	TV1A	86-24 Nal	A	124	127	-	-	+++	-	X	-	+	-	-
6	TV1A	86-24 Nal	A	130	136	-	-	+	+	X	-	-	-	-
7	TV1A	LB226692	A	113	102	-	-	++	-	X	-	+	-	-
8	TV1A	LB226692	A	131	105	-	-	+	+	X	-	+	-	-
9	TV1A	LB226692	A	132	166	-	-	++	-	X	-	+	-	-
10	TV1B	123	A	116	108	-	-	+	+	X	-	-	-	-
11	TV1B	123	A	116	120	-	-	+	+	X	-	+	-	-
12	TV1B	86-24 Nal	A	114	101	-	-	+	+	X	-	-	-	-
13	TV1B	86-24 Nal	A	106	113	-	-	-	-	X	-	-	-	-
14	TV1B	LB226692	A	112	120	-	-	+	+	X	-	-	-	-
15	TV1B	LB226692	A	99	113	-	-	-	+	X	-	-	-	-

Tab. 22 (Fortsetzung)

Tier -nr.	Versuch	<i>E. coli</i> - Inokula- tionsstamm	Betrieb	Alter* [d]	Gewicht* [kg]	Untersuchung auf							
						<i>Yersinia</i> spp.	<i>Salm.</i> spp.	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Trichuri</i> spp.s	Lungen- würmer	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>aggR</i>
16	TV2	123	B	96	85	-	-	+++	-	-	+	+	-
17	TV2	123	C	120	132	-	-	+++	-	-	-	+	-
18	TV2	123	C	137	125	-	-	+	-	-	+	-	-
19	TV2	123	A	101	93	-	-	+	-	-	-	-	-
20	TV2	123	A	94	96	-	-	-	-	-	+	+	-
21	TV2	86-24 Nal	B	92	118	-	-	-	-	-	-	-	-
22	TV2	86-24 Nal	B	92	102	-	-	-	-	-	+	+	-
23	TV2	86-24 Nal	C	125	120	-	-	++	+	-	+	+	-
24	TV2	86-24 Nal	C	123	155	-	-	++	+	-	+	+	-
25	TV2	86-24 Nal	A	96	129	-	-	+	-	-	-	+	-
26	TV2	LB226692	B	96	88	-	-	-	-	-	-	-	-
27	TV2	LB226692	B	89	113	-	-	-	-	-	+	-	-
28	TV2	LB226692	C	117	128	-	-	++	+	-	+	+	-
29	TV2	LB226692	A	95	108	-	-	+	-	-	+	-	-
30	TV2	LB226692	A	87	93	-	-	++	-	-	+	-	-

**Erläuterung:** +: positiv; -: negativ; x: nicht getestet; \* zum Zeitpunkt der Einstallung, **Salm** = *Salmonella*

**Tab. 23:** Einzelwerte der fäkalen Ausscheidung der Inokulationsstämme in TV1

Tier- nr.	<i>E. coli</i> - Inokula- tionsstamm	KbE/g Kot [log10] an den einzelnen Versuchstagen											
		Tag 0_vm	Tag 0_nm	Tag 1_vm	Tag 1_nm	Tag 2_vm	Tag 2_nm	Tag 3_vm	Tag 3_nm	Tag 4			
1	123	0,00	0,00	5,88	5,08	4,19	2,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	123	0,00	0,00	6,51	5,45	3,93	4,75	3,60	3,60	3,60	3,60	0,00	0,00
3	123	0,00	0,00	5,95	5,45	4,65	4,99	4,56	3,88	3,88	3,88	0,00	0,00
10	123	0,00	0,00	5,39	5,07	4,36	4,24	2,70	3,23	3,23	3,23	1,00	1,00
11	123	0,00	0,00	6,57	6,11	5,32	5,77	5,13	4,72	4,72	4,72	3,26	3,26
4	86-24 Nal	0,00	0,00	6,47	6,14	6,24	6,59	6,37	6,00	6,00	6,00	6,03	6,03
5	86-24 Nal	0,00	3,18	6,67	5,91	5,85	5,26	5,60	5,20	5,20	5,20	5,61	5,61
6	86-24 Nal	0,00	0,00	6,91	6,24	6,34	6,13	6,66	6,11	6,11	6,11	5,13	5,13
12	86-24 Nal	0,00	0,00	4,63	5,03	3,76	3,18	3,83	3,23	3,23	3,23	2,90	2,90
13	86-24 Nal	0,00	0,00	5,92	5,62	6,72	6,51	5,13	4,60	4,60	4,60	4,57	4,57
7	LB226692	0,00	0,00	7,03	6,41	5,91	3,85	6,17	5,09	5,09	5,09	5,82	5,82
8	LB226692	0,00	0,00	6,53	5,36	5,45	4,08	4,70	3,30	3,30	3,30	0,00	0,00
9	LB226692	0,00	0,00	7,38	6,09	3,74	5,26	4,70	5,36	5,36	5,36	4,43	4,43
14	LB226692	0,00	0,00	5,61	6,00	5,85	4,64	4,13	4,05	4,05	4,05	4,06	4,06
15	LB226692	0,00	0,00	5,85	5,49	5,61	4,98	8,10	5,23	5,23	5,23	4,23	4,23

**Erläuterung:** KbE = Kolonie-bildende Einheiten, nm = nachmittags, vm = vormittags

**Tab. 24:** Einzelwerte der fäkalen Ausscheidung der Inokulationsstämme in TV2

Tier- nr.	<i>E. coli</i> - Inokula- tionsstamm	KbE/g Kot [log10] an den einzelnen Versuchstagen																														
		0	1	2	3	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28														
16	123	0,00	5,26	3,70	3,00	2,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
17	123	0,00	3,73	2,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
18	123	0,00	3,99	3,04	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
19	123	0,00	4,81	4,40	4,43	0,00	2,00	2,30	2,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
20	123	0,00	0,00	4,16	2,48	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
21	86-24 Nal	0,00	5,41	4,41	4,51	4,22	5,00	4,59	4,43	4,48	5,90	5,69	6,90	3,76	2,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
22	86-24 Nal	0,00	6,75	6,06	3,96	3,88	6,53	4,45	1,00	1,00	0,00	3,11	2,60	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,15	0,00
23	86-24 Nal	0,00	5,23	5,04	5,56	5,66	5,67	3,41	2,62	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	
24	86-24 Nal	0,00	5,09	5,17	5,00	4,48	3,32	3,58	3,00	2,30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
25	86-24 Nal	0,00	5,81	4,43	4,53	3,38	6,49	4,90	3,28	2,70	4,73	2,48	3,26	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,48	0,00
26	LB226692	0,00	5,54	4,28	3,28	2,85	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	LB226692	0,00	5,79	4,54	3,59	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
28	LB226692	0,00	5,01	4,57	3,99	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	LB226692	0,00	4,86	3,67	4,95	4,62	3,38	3,48	3,68	3,68	3,49	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00
30	LB226692	0,00	5,77	5,79	4,36	3,38	3,08	2,95	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**Erläuterung: KbE** = Kolonie-bildende Einheiten

**Tab. 25:** Einzelwerte des Nachweises der Inokulationsstämme in den einzelnen Darmabschnitten in TV1 (4 dpi)

Tier- nr.	<i>E. coli</i> - Inokula- tions- stamm	KbE/g Probe [log10]										Darminhalt						
		Gewebeproben					Darminhalt					Darminhalt						
		Tons	Duo	Jej	JPP	IPP	ICE	Cec	PC	AC	DC	RAJ	Kot	PC	RAJ	Pans	Abo	GB
1	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,48	0,00	2,00	0,00	0,00
2	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,28	0,00	0,00	0,00
3	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,18	0,00	0,00	0,00
10	123	0,00	0,00	0,00	4,12	2,30	4,51	3,36	3,00	4,04	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,61	3,90	0,00	0,00	0,00	0,00	3,23	2,30	3,26	0,00	0,00	0,00
4	86-24 Nal	0,00	0,00	0,00	0,00	2,78	3,91	2,90	4,76	2,30	2,30	6,06	6,03	3,20	5,85	2,78	0,00	0,00
5	86-24 Nal	0,00	0,00	n.t.	0,00	2,78	6,42	3,00	4,13	3,51	3,70	6,01	5,61	4,41	6,20	2,90	0,00	0,00
6	86-24 Nal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,80	5,13	4,16	4,40	0,00	0,00	0,00
12	86-24 Nal	0,00	2,60	0,00	2,78	0,00	7,61	5,38	4,60	4,92	4,32	5,26	2,90	3,65	3,04	0,00	0,00	0,00
13	86-24 Nal	4,19	0,00	0,00	0,00	7,02	7,01	7,06	6,66	7,08	5,62	7,45	4,57	5,05	5,46	0,00	0,00	0,00
7	LB2226692	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,10	6,84	7,01	4,90	4,62	6,81	5,80	5,57	7,08	2,00	0,00	3,23
8	LB2226692	0,00	0,00	3,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,16	7,75	2,70	0,00	3,20
9	LB2226692	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	4,83	5,15	2,70	4,06	0,00	4,52	5,30	5,66	2,78	6,02	0,00
14	LB2226692	2,48	5,10	0,00	2,85	3,00	4,82	5,89	3,91	4,57	0,00	4,51	4,06	3,67	3,48	0,00	0,00	0,00
15	LB2226692	0,00	0,00	4,52	5,81	5,55	4,37	6,36	5,40	5,43	5,41	4,75	4,23	4,40	5,07	0,00	0,00	0,00

**Erläuterung:** Abo = Abomasum, AC = *Ansa centralis*, Cec = Zäkum, DC = distales Kolon, dpi = Tage nach Inokulation, Duo = *Duodenum*, GB = Gallenblase, ICE = IleoZäkalklappe, IPP = Peyer-Platten des *Ileums*, Jej = *Jejunum*, JPP = Peyer-Platten des *Jejunums*, KBE = Kolonie-bildende Einheiten, n.t. = nicht getestet, PC = proximales Kolon, RAJ = *rectoanal junction*, Pans = Pansen, Tons = Tonsille

**außerdem getestet, ohne positiven Befund:** Abomasum (Gewebe), Gallenblase (Gewebe), Leber, *Lymphonodus cecalis*, *Lymphonodus jejunalis*

**Tab. 26:** Einzelwerte des Nachweises der Inokulationsstämme in den einzelnen Darmabschnitten in TV2 (28 dpi)

Tier- nr.	<i>E. coli</i> - Inokula- tionsstamm	KbE/g Probe [log10]				
		Gewebeproben				Darminhalt
		Kot	Jej	IPP	RAJ	PC
16	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	123	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	86-24 Nal	1,00	0,00	0,00	4,68	0,00
22	86-24 Nal	3,15	0,00	0,00	2,60	0,00
23	86-24 Nal	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	86-24 Nal	1,00	3,20	0,00	0,00	2,00
25	86-24 Nal	3,48	0,00	2,60	4,25	0,00
26	LB226692	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	LB226692	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	LB226692	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	LB226692	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	LB226692	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**Erläuterung:** dpi = Tage nach Inokulation, IPP = Peyer-Platten des *Ileums*, Jej = *Jejunum*, KbE = Kolonie-bildende Einheiten, PC = proximales Kolon, RAJ = *rectoanal junction*

**außerdem getestet, ohne positiven Befund:** *Duodenum*, Peyer-Platten des *Jejunums*, Ileozäkalklappe, Zäkum, proximales Kolon, *Ansa centralis*, distales Kolon, *rectoanal junction* (Inhalt), Gallenblase (Inhalt)

## 11.2 Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 11.2.1 Geräte

Gerät/Modell	Firma
Brutschrank MCO-19AIC CO <sub>2</sub> incubator	Fa. Panasonic (ehem. Sanyo) Biomedical Sales, Etten Leur, NL
Brutschrank WTB Binder	Fa. Binder GmbH, Tuttlingen
Elektrophoresekammer für Agarosegele, Model 41-1325	Fa. Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer für Agarosegele, Model Mupid-One	Fa. Advance Co. Ltd., Tokio, Japan
Feinwaage MC1 LC 820	Fa. Sartorius, Göttingen
Geldokumentationssystem G:BOX EF	Fa. Syngene, Cambridge, UK
Gewebeeinbettungsautomat Tissue-Tek VIP®	Fa. Sakura Fintek U.S.A., Inc., Torrance, USA
Hybridisierungsöfen Unitherm 6/12	Fa. LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg/Bodensee
Mehrkanalpipette Xplorer®, 8-Kanal, 5 – 100 µL	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskopkamera Leica DFC450C	Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowellengerät 8018	Fa. Privileg, Stuttgart
Minimix (Stomacher), Model W	Fa. interscience, Saint Nom, Frankreich
Minishaker MS1	Fa. IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Multipette® plus	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Fa. Fein-Optik, Bad Blankenburg
Paraffinausgießstation Tissue-Tek® TEC® 5	Fa. Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Pipetboy acu 2	Fa. Integra Biosciences AG, Zizers, CH
Pipetten, Pipetman Classic™, P 2, P 10, P 20, P 100, P 200, P 1 000	Fa. Gilson, Inc., Middleton, USA
Pipetten, Reference® o. Research® plus, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1 000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Plattenphotometer Sunrise™	Fa. Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Plattformschüttler Duomax 1030	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Präzisionswaage Extend ED323S – CW	Fa. Sartorius AG, Göttingen
Reagenzglasschüttler lab dancer	Fa. IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Rotationsmicrotom HM355S	Fa. Microm, Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot
Schüttelwasserbad GFL 1092	Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank Biowizard KR-130	Fa. Kojair Tech Oy, Vilppula, FI

Gerät/Modell	Firma
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot
Sicherheitswerkbank BioVanguard 6	Fa. Telstar, JA Woerden, NL
Spannungsgerät 1000/500 Power Supply	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Stomacher Lab-Blender 80, Model-No. BA 6020	Fa. Seward Medical, Worthing; UK
Systemmikroskop BX41	Fa. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Thermocycler TPersonal 48	Fa. Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer® comfort	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
ThermoStat plus™	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge MiniSpin	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank HST 5020	Fa. VEB MLM Dentalfabrik, Treffurt
Vortex 2 Genie G-560E	Fa. Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage MC1 LC 820	Fa. Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Universal 30 RF	Fa. Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge Labofuge 400	Fa. Heraeus Instruments GmbH, Hanau

### 11.2.2 Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	M2128
3,3`- Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (DAB)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	32750-5G-F
4-Nitro blue tetrazolium chloride, solution (NBT)	Fa. Roche, Mannheim	11383213001
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt (BCIP)	Fa. Roche, Mannheim	11383221001
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	Fa. Peqlab, Erlangen	35-1020
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments from sheep	Fa. Roche, Mannheim	11093274910
Blut (Rind), steril defibriniert	Fa. Fiebig, Idstein - Niederauroff	40000500
Blut-Agar (Basis)	Fa. SIFIN, Berlin	TN1106
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraction V, pH 7,0	Fa. SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11930.03
Brilliance ESBL Agar	Fa. Oxoid, Wesel	PO5302A

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nr.</b>
CASO-(Tryptic-Soy)-Broth (Trockennährmedium)	Fa. SIFIN, Berlin	TN 1263
Chromalaun	VEB Laborchemie Apolda	-
Diazepam-ratiopharm® 10 Injektionsloesung	Fa. WDT, Garbsen	05300
DIG Easy Hyb	Fa. Roche, Mannheim	11603558001
DIG Wash and Block Buffer Set	Fa. Roche, Mannheim	11585762001
<i>E. coli</i> K9 antiserum	Fa. Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark über Fa. medco Diagnostika GmbH, München	55344
<i>E. coli</i> O43 antiserum	Fa. Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark über Fa. medco Diagnostika GmbH, München	85040
<i>E. coli</i> OK O157 antiserum	Fa. Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark über Fa. medco Diagnostika GmbH, München	44309
Eosin G	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	7089.1
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	2218.3
Fetales Kälberserum (FKS)	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	10664083
Formaldehydlösung, min. 37 %, säurefrei	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1039992500
Gassner-Agar (Basis)	Fa. SIFIN, Berlin	TN 1194
Gelatine, from porcine skin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	48722
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	SM0323
Glycerin, wasserfrei	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3783.1
Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L) Antikörper, Peroxidase-AffiniPure	Fa. Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA	111-035-003
Hämatoxylin	Fa. Riedel de Haen, Seelze	-
Kaiser´s Glyceringelatine	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	1092420100
Kanadabalsam	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	8016.2
Ketamin 10 %	Fa. WDT, Garbsen	21114

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikel-Nr.</b>
Ladepuffer DNA Loading Dye (6 x)	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	SM0323
MacConkey-Agar (Basis)	Fa. SIFIN, Berlin	TN1156
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1100500
Nährbouillon I (Trockennährmedium)	Fa. SIFIN, Berlin	TN 1172
Nalidixinsäure	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	N8878
Natriumchlorid	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	HN00.1
NH <sub>4</sub> -Mix (10 x PCR-Puffer)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1100500
Nukleotide, dNTP	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	PAN 739028
PANScript Polymerase (5 U/μl)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1100500
Paraffin Typ 6, 10 x 2 LB	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	10279858
Paraffin Typ 1, 10 x 2 LB	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	10096688
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Fa. Roche, Mannheim	11636090910
PCR Primer	Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg	-
Penicillin (10 000 IE/ml)/ Streptomycin (10 000 μg/ml)-Lösung	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	P06-07100
Pentobarbital-Natrium (Release®, 500 mg/ml)	Fa. WDT, Garbsen	25574
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 49.5:49.5:1	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	77618
Polymyxin B - Sulfat	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt	A0890
Proteinase K, recombinant, PCR Grade, 100 mg	Fa. Roche, Mannheim	3115879001
RNase-free DEPC behandeltes Wasser	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	T 143.2
RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	P04-16500
Salzsäure 32 %	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	P074.4
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4360.1
TBE-Puffer (10 x)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3061.2

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Thymol	Thüringische Universitäts- klinikapotheke Jena	-
Trypanblau-Lösung	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	93595
Trypsin (Histo), from porcine pancreas	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	93613
Trypsin, lyophilisiert	Fa. SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	37289.01
Wasserstoffperoxid 30 %	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	8.22287.1000
Xylazin (Rompun® 2 %)	Fa. WDT, Garbsen	03406
Xylol, > 98 %, rein	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	9713.4
Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Peroxidase AffiniPure Goat Anti- Rabbit IgG (H+L))	Fa. Jackson Immuno Research, Newmarket, UK	111-035-003

### 11.2.3 Verbrauchsmaterial

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
10 ml Einmalspritzen HSW SOFT- JECT®	Fa. WDT, Garbsen	93155
20 ml Einmalspritzen HSW SOFT- JECT®	Fa. WDT, Garbsen	93156
50 ml Spritze, Luer-Lock	Fa. A. Hartenstein, Würzburg	SE24
15 ml Plastikröhrchen	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	188271
50 ml Plastikröhrchen	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	227261
Blotting papers (= Filterpapier)	Fa. Neolab, Heidelberg	742113
Blutentnahmebesteck nach Strauß, 1,8 mm	Fa. WDT, Garbsen	29431
Combitips advanced®, 10 ml/ 5 ml/ 1 ml	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030089642/ 669/ 677
CryoPure 5,0 ml Röhren	Fa. Sarstedt, Nümbrecht	72.383.007
Deckgläser, 24 x 24 mm/24 x 32 mm	Fa. Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edemünde	k12424/k12432

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Einbettungskassetten	Fa. Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde	17980
Einmalkanülen curaVet EASY-LANCE, 1,2 x 40 mm	Fa. WDT, Garbsen	90278
Filterspitzen, TipOne®, 10 µl, 200 µl, 1 000 µl	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	S1121-3810, S1120-8810, S1122-1830
Homogenisationsbeutel (Grade Standard 80 Blender Bags)	Fa. VWR International GmbH, Hannover	432-0000
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	E3090-6222
Mikrotiterplatten, 96-Loch, Flachboden	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	167008
Monovette® (92 x 16 mm) zur Serumgewinnung	Fa. Sarstedt, Nümbrecht	02.263
Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization	Fa. Roche, Mannheim	11699075001
Objektträger, StarFrost	Fa. Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde	11240
Adhäsionsobjektträger, Süsefrost plus	Fa. Süsse GmbH, Gudensberg	041300A
PCR-Gefäße, 0,2 ml	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	I1402-8100
Petrischalen, steril, 94 mm	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	633102
Pipettenspitzen TipOne®, 1000 µl	Fa. Starlab GmbH, Hamburg	S1111-2020
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Standard, 0,5 – 20 µl/ 2 – 200 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030000854/ 870
Plastik-Reaktionsgefäße 1,5/ 2,0 ml	Fa. A. Hartenstein, Würzburg	RK1G/ RK2G
<i>safe lock</i> Plastik-Reaktionsgefäße 1,5/ 2,0 ml	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030120086/ 94
Shandon™ Glass Coverplates	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	72110017
Slide Racks	Fa. Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot	73310017
Spatel, T-Form	Fa. VWR International GmbH, Hannover	612-2653
Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm	Fa. Neolab, Heidelberg	7-9000
Urinbecher 125 ml mit Schraubdeckel	Fa. WDT, Garbsen	90151
Vakuumflasche 500 ml zur Transfusion	Fa. WDT, Garbsen	27526

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Venenverweilkanüle Vasofix Braunüle, 1,7 x 50 mm	Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen	4268172B
Zellkultur-Flaschen, Corning®, 75 cm <sup>2</sup>	Fa. Corning B.V. Life Science, Amsterdam, NL	430725
Whatman® gel blotting paper, Grade GB003 (= Vlies)	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Z698202

## 11.3 Verwendete Puffer und Medien

### 11.3.1 Puffer und Medien für die bakteriologischen Methoden

#### Blutagar

Blutagar (Basis)	36,0 g
Blut (Rind), steril defibriniert	7,5 %
<i>Aqua destillata</i>	1 000,0 ml

#### CASOB-Glycerol-Lösung

CASO-Bouillon	250 ml
Glycerol	100 ml
<i>Aqua destillata</i>	150 ml

#### CASO-Bouillon

CASO-(Tryptic-Soy)-Broth (Trockennährmedium)	30,0 g
<i>Aqua destillata</i>	1 000,0 ml

#### Gassner-Agar

Gassner-Agar (Basis)	47,7 g
<i>Aqua destillata</i>	1 000,0 ml

#### MacCONKEY-Agar

MacConkey-Agar (Basis)	48,5 g
<i>Aqua destillata</i>	1 000,0 ml

#### MacCONKEY-Agar-Nal (50 µg/ml)

MacConkey-Agar (Basis)	48,5 g
Nalidixinsäure-Stammlösung	2,0 ml
<i>Aqua destillata</i>	1 000,0 ml

#### MacCONKEY-Agar-Nal (20 µg/ml)

MacConkey-Agar (Basis)	48,5 g
Nalidixinsäure-Stammlösung	800 µl
<i>Aqua destillata</i>	1 000,0 ml

NaCl-Lösung (0,89 %)

Natriumchlorid

8,9 g

*A. dest.*

ad 1 000,0 ml

Nalidixinsäure-Stammlösung (25 mg/ml)

Nalidixinsäure

0,25 g

NaOH (0,2 M)

10,0 ml

Nährbouillon (NB)

Nährbouillon I (Trockennährmedium)

25,0 g

*Aqua destillata*

1 000,0 ml

PBS-Puffer<sup>A</sup> (pH 7,4)PBS-Stammlösung<sup>A</sup> 10x

100,0 ml

*Aqua destillata*

ad 1 000,0 ml

PBS-Stammlösung<sup>A</sup> 10x (pH 7,4)

NaCl

100,0 g

KCl

2,5 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2,5 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

18,0 g

*Aqua destillata*

1 000,0 ml

Polymyxin B-Lösung

Polymyxin B - Sulfat

1,0 mg

NaCl-Lösung (0,89 %)

1,0 ml

**11.3.2 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden**Blockpuffer (1x)

Blockingpuffer (10x, DIG Wash and Block Buffer Set)

5,0 ml

Maleinsäurepuffer (1x)

45,0 ml

Denaturierungslösung

NaOH (0,5 M)

20,005 g

NaCl (1,5 M)

87,62 g

*Aqua destillata.*

ad 1 000,0 ml

Detektionspuffer (10x)

Tris-HCl (1 M, pH 9,5)

39,4 g

NaCl (1 M)

14,6 g

*Aqua destillata.*

ad 250,0 ml

## 11 Anhang

---

### Detektionspuffer (1x)

Detektionspuffer (10x, DIG Wash and Block Buffer Set oder eigene Herstellung)	4,4 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 44,0 ml

### Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (1 mg/ml)

Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	1,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 10,0 ml

### Hybridisierungslösung

markierte DNS-Sonde	16,0 µl
DIG Easy Hyb-Lösung	8,0 ml

### Konjugatlösung (1:5.000)

Anti-Digoxigenin-AP	4,8 µl
Blockpuffer (1x)	ad 24,0 ml

### Lysepuffer

10 % SDS	3,0 ml
Tris (250 mM, ungepuffert)	2,0 ml
NaOH (5 N) -> unmittelbar vor Gebrauch zugeben!	150,0 µl
<i>Aqua destillata.</i>	4,75 ml

### Neutralisierungslösung (pH 7,4)

Tris-HCl (1,0 M)	121,14 g
NaCl (1,5 M)	87,62 g
<i>Aqua destillata.</i>	ad 1 000,0 ml

### Maleinsäurepuffer (1x)

Maleinsäurepuffer (10x, DIG Wash and Block Buffer Set)	4,5 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 45,0 ml

### Proteinase K-Lösung

Proteinase K (20 mg/ml in <i>A. dest.</i> gelöst)	500,0 µl
SSC (2x)	5,0 ml

### TAE-Puffer (50x)

Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 1 000,0 ml

### TAE-Laufpuffer (1x)

TAE-Puffer (50x)	20,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 1 000,0 ml

<u>TBE-Laufpuffer (1x)</u>	
TBE-Puffer (10 x)	100,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 1 000,0 ml
<u>TE-Puffer (pH 7,5)</u>	
Tris-HCl	10 mmol/l
EDTA-acid	1 mmol/l
<i>in Aqua destillata</i>	
<u>SDS-Lösung (10 %)</u>	
Dodezylsulfat Natriumsalz	10,0 g
HCl 1 N	1,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 100,0 ml
<u>20x SSC (pH 7,0)</u>	
Na-Zitrat (0,3 M)	88,23 g
NaCl (3 M)	175,23 g
<i>Aqua destillata.</i>	ad 1 000,0 ml
<u>2x SSC (pH 7,0)</u>	
SSC (20x)	100,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 1 000,0 ml
<u>2x SSC/0,1 % SDS</u>	
SSC (2x)	99,0 ml
SDS-Lösung (10 %)	1,0 ml
<u>0,5x SSC/0,1 % SDS</u>	
SSC (2x)	25,0 ml
SDS-Lösung (10 %)	1,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 100,0 ml
<u>Substratlösung (1x)</u>	
4-Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)	110,0 µl
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	82,5 µl
Detektionspuffer (1x)	22,0 ml
<u>Waschpuffer (1x)</u>	
Waschpuffer (10x, DIG Wash and Block Buffer Set)	10,0 ml
<i>Aqua destillata.</i>	ad 100,0 ml

**11.3.3 Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturmethoden**MTT-Stammlösung (5 mg/ml)

MTT	0,5 g
PBS-Puffer <sup>A</sup> (1x)	ad 100,0 ml

NaCl-Lösung (0,89 %)

NaCl	8,9 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

PBS-Puffer<sup>A</sup> (pH 7,4)

PBS 10x Stammlösung <sup>A</sup>	100,0 ml
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

PBS-Stammlösung<sup>A</sup> 10x (pH 7,4)

NaCl	100,0 g
KCl	2,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	18,0 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

SDS-Lösung (1 %)

Na-Dodecylsulfat	0,5 g
NaCl-Lösung (0,89 %)	50 ml

SDS-Lösung (10 %)

Na-Dodecylsulfat	100,0 g
HCl 1N	10,0 ml
<i>Aqua destillata</i>	1 000,0 ml

Trypsinlösung<sup>A</sup> 10x (pH 7,2 – 7,3)

Trypsin, lyophilisiert	0,5 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,8 g
Dextrose	1,0 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,58 g
EDTA-Na	0,2 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000 ml

Zellkulturmedium 1

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	890,0 ml
FKS	100,0 ml
Penicillin (10 000 IE/ml)/ Streptomycin (10 000 µg/ml)-Lösung	10,0 ml

Zellkulturmedium 2

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	790,0 ml
FKS	200,0 ml
Penicillin (10 000 IE/ml)/ Streptomycin (10 000 µg/ml)-Lösung	10,0 ml

**11.3.4 Puffer und Reagenzien für die histologischen Methoden**BSA/DPBS-Puffer

Bovines Serum Albumin (BSA)	12,5 g
DPBS-Gebrauchslösung	100,0 ml

Chromalaungelatine

Gelatine (4,5 mg/ml in <i>Aqua destillata</i> gelöst)	100,0 ml
Chromalaun (40 mg/ml in <i>Aqua destillata</i> gelöst)	3,85 ml
Thymol	5 Körnchen

DAB-Lösung

3,3`-Diaminobenzidine (DAB)	24,0 mg
PBS-Puffer <sup>B</sup>	40,0 ml
Wasserstoffperoxid 30 % (1:10 in <i>Aqua destillata</i> verdünnt)	400,0 µl

Dulbecco´s PBS-Puffer (DPBS)-Stammlösung

Natriumchlorid	40,0 g
Kaliumchlorid	1,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	7,15 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

Dulbecco´s PBS-Puffer (DPBS)-Gebrauchslösung

DPBS-Stammlösung	200,0 ml
<i>Aqua destillata</i> .	800,0 ml

Eosin (1%ig)

Eosin G	1,0 g
Alkohol (50%ig)	100,0 ml
Eisessig	1 Tropfen

Hämalaun-Lösung nach P. Mayer

Hämatoxylin	1,0 g
Natriumjodat (NaJO <sub>3</sub> )	0,2 g
Kalialaun (KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	50,0 g
Chloralhydrat	50,0 g
Zitronensäure, kristallisiert	1,0 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

## 11 Anhang

---

### Karbolxylo

Phenol	10,0 g
Xylol	100,0 ml

### Neutral gepuffertes Formalin nach Lillie (4 %ig)

Formaldehydlösung, min. 37 %, säurefrei	100,0 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	4,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	16,4 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

### PBS–Stammlösung<sup>B</sup> (pH 6,8)

Natriumchlorid	40,0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	8,8 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

### PBS–Puffer<sup>B</sup> (pH 7,1)

PBS–Stammlösung <sup>B</sup>	200,0 ml
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 000,0 ml

### Trypsinlösung<sup>B</sup> (pH 7,8)

Trypsin (Histo)	0,05 g
Calciumchlorid	0,05 g
<i>Aqua destillata</i>	50,0 ml

---

## 12 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Menge bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas, die Konzeption und die Betreuung der Arbeit. Sein umfangreiches Wissen, seine konstruktive Kritik und die vielen Anregungen und Diskussionen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für seine Geduld und Hilfestellung bei allen Fragen rund um die Arbeit sowie die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit bin ich sehr dankbar.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Stefanie Barth für ihre engagierte Einarbeitung in diverse Methoden, sowie für ihre Geduld bei der Beantwortung zahlreicher Fragen rund um die Doktorarbeit. Neben der fachlichen Betreuung hat auch ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke für so manch freundschaftliches Gespräch und ihr stets offenes Ohr in allen Belangen. Herrn Dr. Lutz Geue danke ich für die aufmunternden Worte und seinen motivierenden Optimismus. Bei Prof. Dr. Jens Peter Teifke möchte ich mich für die inhaltliche und organisatorische Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Tierversuche bedanken. Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau Dr. Kerstin Tauscher für die gute Zusammenarbeit und Ihre großartige Hilfe im Rahmen der Sektionen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Elke Lange und Frau Bärbel Hammerschmidt für ihre große Einsatzbereitschaft, ihre herzliche Art und warmen Worte. Dem gesamten Team des Tierhauses auf der Insel Riems danke ich für die Unterstützung bei der Gewinnung und Aufarbeitung der Proben, der engagierten Pflege der Tiere sowie der entgegengebrachten Flexibilität.

Herrn DVM Günter Kotterba danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes auf der Insel Riems sowie für die zur Durchführung des Projektes entgegengebrachte Unterstützung. Ganz besonders möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Frau Birgit Mintel für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Liebler-Tenorio für die konstruktive Zusammenarbeit und gewährte Unterstützung sowie bei Frau Sabine Lied und Frau Lisa Wirker für die tatkräftige Hilfe bei der Bearbeitung der histologischen Proben und die freundliche Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau Sarah Stalb, die mich nicht nur tatkräftig während der Versuche unterstützte, sondern mir auch immer eine große seelische Unter-

---

stützung war. Vielen Dank für die lustigen Stunden auf der einsamen Insel und deine Freundschaft.

Für ihre helfende Hand im Labor sei Frau Anja Müller gedankt, die mir eine unschätzbare Hilfe war. Ihr danke ich für die gute Zusammenarbeit und das stets freundliche Miteinander. Ebenso danke ich Frau Anke Hinsching, die immer da war, wenn noch eine helfende Hand gebraucht wurde.

Allen Mitarbeitern des Institutes sei für den netten Umgang und die freundschaftliche Atmosphäre gedankt, die sich mit Sicherheit positiv bei der Anfertigung dieser Arbeit ausgewirkt haben. Ein großes Dankeschön geht an meine anderen Co-Doktoranden aus der AG242 (Katharina, Katha, Nadine) und alle übrigen Doktoranden, mit denen ich viel Spaß hatte und so manch schönes Erlebnis teilen konnte. Ich danke euch für diese unvergessliche Zeit und die daraus entstandenen Freundschaften!

Ich danke der Europäischen Kommission für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit im Rahmen des „Siebten Rahmenprogramms für Forschung und technologische Entwicklung“ (FP7), Projekt „ANTICIPATING the Global Onset of Novel Epidemics“.

Danken möchte ich schließlich auch meiner Familie und meinen Freunden, vor allem aber meinen Eltern Dorothea und Bert Hamm, die mir und meinen Geschwistern tiefe Wurzeln und kräftige Flügel gaben. Euer Vertrauen in uns und eure grenzenlose Unterstützung machen uns zu dem was wir sind. Danke sagen möchte ich auch meinen Großeltern, deren großes Interesse am Fortgang der Arbeit stets eine zusätzliche Motivation für mich war. Der größte Dank jedoch gebührt meinem besten Freund und Partner Ronny Kopp für seine seelische Unterstützung, seinen Glauben an mich und seinen festen Willen mit mir durch Dick und Dünn zu gehen.

---

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Katharina Hamm

04. Juni 2015



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6383-2



9 17 8 3 8 3 5 11 9 6 3 8 3 2