

Aus dem Institut für Tierernährung
Des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (MPCR)
zum Nachweis ausgewählter Virulenzfaktoren schweinepathogener
Escherichia coli

- Einsatz bei Ferkeln mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* Zulage -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sandra Göbel
Tierärztin aus Schmallebenberg/ Nordrhein-Westfalen

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2733

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. Brunberg

Erster Gutachter: Prof. Dr. O. Simon

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. L. H. Wieler

Dritter Prüfer: Prof. Dr. K. H. Lahrmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus)

Bacillus cereus, DNA, enterotoxins, Escherichia coli, hybridization, piglet diseases,
polymerase chain reaction, probiotics

Tag der Promotion: 04.07.2003

Get your facts first, and then you can distort 'em as you please.
(Mark Twain, amerikan. Schriftsteller, 1835-1903)

in gedenken an meinen vater

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
2 Literaturübersicht	6
2.1 Escherichia coli	6
2.2 Darmassoziierte E. coli-Infektionen	6
2.2.1 Pathogenese	6
2.2.2 Serotypen / Genotypen	10
2.2.3 Fimbrien	11
2.2.4 Toxine	14
2.2.5 Mechanismen des Gentransfers	17
2.3. Probiotika	22
2.3.1 Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe	22
2.3.2 <i>Bacillus cereus</i>	23
2.4 Molekularbiologische Methoden	25
2.4.1 Gewinnung bakterieller Nukleinsäuren	25
2.4.2 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
2.4.3 Multiplex PCR	30
2.4.4. Hybridisierung von Nukleinsäuren mit markierten Oligonukleotidsonden	32
2.5 Zielstellung	35
3 Material und Methoden	36
3.1 Versuch 1: Fallstudie zum Vorkommen pathogener E. coli beim Ferkel	36
3.1.1 Tierbestand und Fütterung	36
3.1.2 Diagnostische Schlachtungen und Probengewinnung	38
3.1.3 DNA-Präparation	38
3.1.4 Bakterienstämme	38
3.1.5 Primerselektion und Multiplex PCR	40
3.1.6 Digoxigenin-markierte Oligonukleotidsonden	41
3.1.7 Hybridisierungsbedingungen	42
3.1.8 Detektion und Auswertung der Chemilumineszenzsignale	42
3.2 Versuch 2: Untersuchung der Verteilung pathogener E. coli in den institutseigenen Stallanlagen	44
3.2.1 Tierbestand und Fütterung	44
3.2.2 Probengewinnung	44
3.2.3 DNA-Präparation	45
3.2.4 Bakterienstämme	45
3.2.5 Primerselektion und Multiplex PCR	45
3.2.6 Hybridisierungsbedingungen und Detektion	46
3.3 Versuch 3: Wirkung eines Probiotikums auf adhäsive E. coli	47
3.3.1 Tierbestand und Fütterung	47
3.3.2 Diagnostische Schlachtungen und Probengewinnung	47
3.3.3 DNA-Präparation	48

3.3.4 Bakterienstämme	50
3.3.5 Primerselektion und Multiplex PCR	50
3.3.6 Hybridisierungsbedingungen für die Multiplex PCR	55
3.3.7 Statistik.....	56
4 Ergebnisse	57
4.1 Extraktion von Gesamtnukleinsäuren aus Darmmucosa von Ferkeln	57
4.2 PCR Untersuchungen	61
4.2.1 Optimierung der PCR-Bedingungen zum Nachweis von <i>E. coli</i> - Pathogenitätsfaktoren	61
4.3 Optimierung der Hybridisierung interner Oligonukleotidsonden mit PCR-Produkten .	67
4.4 Anwendung der Multiplex PCR.....	69
4.4.1 Fallstudie zum Vorkommen pathogener <i>E. coli</i> beim Ferkel	69
4.4.2 Untersuchung der Verteilung pathogener <i>E. coli</i> in Stallanlagen des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin	71
4.5 Vergleichender qualitativer Nachweis ausgesuchter <i>E. coli</i> -Pathogenitätsfaktoren im Darmtrakt von Ferkeln nach Einsatz von <i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i>	79
5 Diskussion	86
5.1 Methode.....	86
5.1.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Proben der Darmmucosa von Ferkeln	86
5.1.2 PCR und Hybridisierung.....	89
5.2 Anwendung der MPCR	96
5.2.1 Fallstudie zum Vorkommen pathogener <i>E. coli</i> beim Ferkel	96
5.2.2 Untersuchung der Verteilung schweinepathogener <i>E. coli</i> in den Versuchsanlagen	98
5.3 Qualitativer Nachweis ausgesuchter <i>E. coli</i> -Pathogenitätsfaktoren im Darm von Ferkeln nach Einsatz von <i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	102
5.3.1 Verteilung der <i>E. coli</i> -Pathogenitätsfaktoren bei Ferkeln verschiedener Altersgruppen	102
5.3.2 Verteilung der <i>E. coli</i> -Pathogenitätsfaktoren hinsichtlich der verschiedenen Fütterungsgruppen.....	106
5.3.3 Qualitativer Nachweis des <i>fae</i> -Gens in mucosalen DNA-Extrakten von Ferkeln nach Einsatz eines sporenbildenden Probiotikums	112
6 Zusammenfassung.....	114
7 Summary	117
8 Danksagung	119
Anhang	120

8 Danksagung

An dieser Stelle gebührt DR. WILFRIED VAHJEN für seine freundschaftliche und ausgesprochen effiziente wissenschaftliche Betreuung großer Dank. Ohne ihn hätte Nichts funktioniert.

DR. ANKE JADAMUS möchte ich für ihre liebenswerte Unterstützung bei der Einarbeitung in die Institutsabläufe, der Einsicht in ihre umfangreiche Literatur zum Thema "Probiotika" und der Verfügbarkeit und Vollständigkeit der zahlreichen mucosalen Darmproben der Ferkel dieses Versuchs danken.

SIBYLLE WEINHOLZ und STEFANIE BERNHARDT danke ich ganz herzlich für die tatkräftige technische Assistenz im mikrobiologischen und molekularbiologischen Labor.

SUSANNE PLATT (in Kürze selbst Dr.) danke ich herzlichst für die spontane und hochwertige Überarbeitung der englischen Zusammenfassung.

Ich danke LOHMANN ANIMAL HEALTH, CUXHAVEN recht herzlich für die freundliche und finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Ein großer, ganz, ganz herzlicher Dank gebührt PROF. DR. ORTWIN SIMON:
Für seine nie endenwollende Geduld mit einem ‚unwissenschaftlichen‘ Veterinär!

Ich danke SEBASTIAN LEO in aller Zärtlichkeit für seine liebevolle Begleitung und seinen tatkräftigen Beistand während der mitunter beziehungsfeindlichen Schaffens- (und Frustrations) perioden dieser Arbeit. Danke Honey!

Lebenslauf

Name	Sandra Birgit Göbel
Geburtsort/-datum	Schmallenberg (Nordrhein-Westfalen), 30.08.1972
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Mutter	Birgit Göbel, geb. Gniffke, geboren am 13.12.1953 in Erlabrunn
Vater	Klaus Karl Göbel, geboren am 07.07.1953 in Schmallenberg verstorben am 27.12.1985
Schulbildung	1979 - 1982 Katholische Grundschule, Schmallenberg 1982 - 1985 Wilhelm-Hauff-Grundschule, Berlin 1985 - 1991 Diesterweg-Oberschule (Gymnasium), Berlin 1991 - 1993 Anna-Freud-Oberschule (gymnasiale Oberstufe), Berlin Abschluß: 02.06.1993, Abitur
Studium	Okt. 1993 – Jan. 1999 Freie Universität Berlin Fachbereich Veterinärmedizin Abschluß: 27.01.1999, Staatsexamen
Praktika	26. Febr. - 08. März 1996 Landwirtschaftliches Praktikum, Riswick 24. Febr. - 05. April 1997 Praktikum in der Großtierpraxis Dipl.-Vet. Med. Roland Zech, Freudenberg 16. Febr. - 02. April 1998 Praktikum in der Großtierpraxis Dipl.-Vet. Med. Roland Zech, Freudenberg 01. Juli - 14. Aug. 1998 Praktikum im Institut für Veterinär- Pathologie, Freie Universität Berlin
Berufstätigkeit	März 01 - April 01 Klinik für Kleintiere, Magdeburg Mai 01 - November 01 FTA für die tierärztliche Allgemeinpraxis, D. Bausch, Nauen Januar 02 – April 02 Praxisvertretungen über Vertreterring (vetring) Mai 02 – befristet bis Dezember 05 Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für Epidemiologie
Veröffentlichungen aus dem Dissertationsthema	Göbel S., Vahjen W., Jadamus A., Simon O.: PCR Assay zum Nachweis schweinepathogener <i>Escherichia coli</i> Virulenzfaktoren aus dem Verdauungstrakt von Ferkeln bei Einsatz eines sporenbildenden Probiotikums, <i>Proceedings of the Society of Nutrition Physiology</i> 9 , S. 64

Selbstständigkeitsversicherung

Hiermit erkläre ich, Sandra Göbel, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel erstellt zu haben.

Sandra Göbel

Berlin, den 14.05.2003