

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

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>6</b>
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
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>36</b>
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
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
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
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>86</b>
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
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>117</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>119</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>120</b>

## 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