

2 Literaturübersicht

2.1 *Escherichia coli*

Beim Genus *Escherichia* handelt es sich um gram negative, fakultativ anaerobe, häufig peritrich begeißelte, gerade Stäbchen mit einer Größe von 1,1 – 1,5 x 2,0 – 6,0 µm. Viele Stämme bilden Kapseln oder Mikrokapselformen und fermentieren neben D-Glucose auch L-Arabinose, Maltose, D-Mannitol, D-Mannose, L-Rhamnose, Trehalose und D-Xylose unter der Bildung von Säure und Gas. Die bevorzugte Wachstumstemperatur liegt bei 37 °C (Holt *et al.*, 1994).

Der größte Anteil der *Escherichia coli* Stämme sind harmlose, insbesondere den Dickdarm von Warmblütern bevölkernde Bakterien. Sie sind nicht zur Anheftung an die Darmschleimhaut fähig und werden durch die peristaltischen Bewegungen des Darmrohres mit der Digesta aus dem Dünndarm abgeschwemmt. Problematisch für den Wirtsorganismus sind pathogene *E. coli* Bakterien, die nach erfolgter Infektion mit einer ausreichenden Dosis sowie in Zeiten immunogener Schwäche des Wirtes eine Vielzahl von Krankheitsbildern auslösen können. Neben Urogenitalinfektionen, Septikämie und Meningitiden sind pathogene *E. coli* Stämme bevorzugt die Ursache von Durchfallerkrankungen (Holt *et al.*, 1994).

2.2 Darmassoziierte *E. coli*-Infektionen

2.2.1 Pathogenese

Nach oraler Aufnahme pathogener Stämme kommt es zur Anheftung der Bakterien an die Darmschleimhaut. Dazu dienen bakterielle Oberflächenstrukturen, die sich an spezifische Rezeptoren der Enterozyten des Wirtes anlagern und das Abschwemmen der Keime aus dem Darm verhindern. So ist es möglich, dass im Dünndarm des Wirtes eine massenhafte Vermehrung von *E. coli* erfolgen kann. Durch die Bildung von Toxinen und anderen Pathogenitätsfaktoren kommt es zur nachhaltigen Schädigung des Wirtsorganismus. Die Symptomatik der von *E. coli* verursachten Erkrankungen ist vielfältig und in erster Linie

von der Ausstattung mit Virulenzfaktoren, also Anheftungsorganen und Toxinen, abhängig (Bosworth, 1996).

Enterotoxigene *E. coli* (ETEC) verursachen durch die Ausschüttung von Enterotoxinen starken, wässrigen Durchfall. Nicht selten sterben die Tiere an Entkräftung und Dehydratation. Betroffen sind insbesondere Saugferkel und Absetzferkel. Ältere Tiere sind in erster Linie klinisch unauffällige Träger und bilden so oftmals ein unerkanntes Erregerreservoir. Die Krankheit bricht bei Saugferkeln insbesondere dann aus, wenn bei Kontakt zu ETEC belastetem Kot zusätzlich serospezifische Antikörper in der Muttermilch und den Darmsekreten des Ferkels fehlen. Dabei ist zu beachten, dass die spezifische *E. coli* vermittelte Immunität in erster Linie gegen die verschiedenen Fimbrien gerichtet ist und für jeden Anheftungsfaktor erworben werden muß. In Vakzinationsversuchen konnte gezeigt werden, dass gegen einen Adhäsionsfaktor immunisierte Sauen den erworbenen humoralen Schutz mittels Immunglobulinen der Klasse G mit dem Kolostrum, bzw. mittels der Klasse A in der darauffolgenden Laktationsphase an die Ferkel weitergibt (Isaacson *et al.*, 1980; Bertschinger, 1984). Dabei waren die Saugferkel nur gegen eine Infektion mit *E. coli*, die den zuvor geimpften Faktor trugen, geschützt. Gegen die Enterotoxine wird kein gleichwertiger Schutz aufgebaut (Moon, 1981). Sie wirken in ihrer natürlichen Form nicht immunogen. Eine Ausnahme ist das hitzelabile Enterotoxin, das auch eine Wirkung als Adjuvans zeigt (Bertschinger, 1984; Clements *et al.*, 1988). Für die Immunitätslage der Ferkel spielt auch der Zukauf hochtragender Sauen, die bis zur Geburt keine stallspezifische Immunität ausgebildet haben, eine Rolle. Agalaktie der Sau, bzw. starker Rückgang der Milch bei der Nahrungszusammensetzung zum Zeitpunkt der Beifuttergabe sind ebenfalls an der Entstehung der Kolidiarrhoe beteiligt. Viele Faktoren, die mit dem Absetzen assoziiert sind, wie Temperaturschwankungen nach dem Umställen, das Fehlen bakterizider Faktoren, wie Lactoferrin, Lactoperoxidase und Lysozym, mit Absetzen der Milchnahrung, sowie Veränderungen des gastrischen pH, werden für den Ausbruch der Kolidiarrhoe verantwortlich gemacht (Sarmiento *et al.*, 1988). Sarmiento *et al.* zeigten 1988 jedoch nur eine eingeschränkte Verbindung zwischen dem Absetzen und dem Ausbruch der Kolidiarrhoe, da in dieser Studie auch die mit einem F4 positiven ETEC Stamm inokulierten Saugferkel erkrankten und sich darüber hinaus zwischen den Gruppen keine signifikanten Abweichungen bei den Parametern Durchfallinzidenz oder Gewichtszunahme ermitteln ließ. Die abgesetzten Ferkel wiesen jedoch höhere

Diarrhoegrade auf. Die Tierzahl war mit insgesamt 41 Ferkeln, von denen 26 F4 resistent waren und so nicht erkrankten, allerdings relativ klein.

Beim Schwein kann es nach dem Absetzen zu einem Krankheitsbild kommen, das von generalisierten Ödemen und zentralnervösen Störungen geprägt ist und oft von blutigem Durchfall begleitet wird. Die Ödemkrankheit wird von Shigatoxin-produzierenden Stämmen (STEC) verursacht. Hierbei wirken auch plötzliche Wechsel der Futterzusammensetzung beim Absetzen mit *ad libitum* Zugang zu rohfasernarmen, schmackhaften Futter offenbar begünstigend auf den Ausbruch der Erkrankung. Bosworth *et al.* zeigten in einem Vakkzinationsversuch, dass eine proteinreiche Ernährung die Empfänglichkeit für die Ödemkrankheit maßgeblich erhöht (Bosworth *et al.*, 1996). Eine zweite wesentliche Ursache könnte das Fehlen maternalen Antikörper nach dem Absetzen der Milchfütterung sein.

STEC sind auch einer Durchfallerkrankung beteiligt, die bevorzugt bei Absetzferkel auftritt und aus diesem Grund als postweaning diarrhea (PWD) bezeichnet wird. Beide Symptomenkomplexe, das der Ödemkrankheit und der PWD, können sich je nach Ausstattung des Erregers mit Pathogenitätsfaktoren, im Einzelfall überlappen.

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) zeichnen sich in der Regel durch das Fehlen von Enterotoxinen aus und sind sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Tierarten an juvenilen Durchfallerkrankungen beteiligt. Als Pathogenitätsfaktor kommt der ‚effacing and attaching‘ Faktor Intimin vor, der als membranständiges Protein einen engen Kontakt der Bakterien zum Enterozyten vermittelt, nachdem die Anheftung mittels als ‚bundle-forming Pili‘ bezeichnete Fimbrien erfolgt ist (Nataro und Kaper, 1998). Als Resultat einer Strukturänderung des Zytoskeletts der Enterozyten (Kenny *et al.*, 1996) kommt es bevorzugt an der apikalen Seite der Darmzotten zu histopathologisch charakteristischen ‚attaching and effacing‘ (AE) Läsionen. Der Verlust von Mikrovilli und die dadurch herabgesetzte Resorption von Flüssigkeit können zu starken Durchfällen führen. Interessanterweise sind einmal angeheftete EPEC auch in der Lage, ihre Position an der Zelloberfläche zu verändern. Dabei können bis zu 0,07 Micrometer/sec zurückgelegt werden (Sanger *et al.*, 1996). *Eae* kommt auch bei den für menschen pathogenen EHEC vor, und ein Vergleich der *eae* Gene von EPEC und EHEC wies auf eine funktionale Homologie hin (Donnenberg *et al.*, 1993). Sequenzanalysen der Intimine von *E. coli*, die jeweils für Menschen, Kaninchen oder Schweine pathogen sind, ergab ein

hohes Maß an Übereinstimmung am N-terminalen Ende des Proteins, während diese am C-terminalen Ende nicht so ausgeprägt war (Agin und Wolf, 1997). Aus der Kreuzreaktivität verschiedener Antisera wurde geschlossen, dass mindestens drei Familien verwandter Intimine existieren und ein Intimin offenbar wirtsspeziesübergreifend bei allen *E. coli*-Serogruppen vorkommt.

Bei humanen Infektionen mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) kommt es zu einer hämorrhagischen Colitis, bzw. hämorrhagischen Gastroenteritis (HGE) und im Verlaufe der Infektion auch zusätzlich zum Urämischen Syndrom. Dass Rinder ein Erregerreservoir dieser Stämme sind und somit eine große Gefahr für den Verbraucher darstellen können, ist insbesondere für die angehörigen Stämme der Serogruppe O157 bekannt (Fratamico *et al.*, 2000, Meng *et al.*, 1997). Wieler *et al.* 1998 zeigten außerdem, dass darüber hinaus Stämme der Serogruppe O118, die häufigste Shiga Toxin produzierenden Stämme beim Kalb, auch für den Menschen ein großes Gesundheitsrisiko darstellen. Dabei ist nicht nur der Weg über das Lebensmittel relevant, sondern offenbar auch die direkte Übertragung vom Tier auf den Menschen möglich (Weber *et al.* 1997), so dass EHEC in der Gruppe der Shigatoxin-produzierenden *E. coli* als Zoonoseerreger eine große Bedeutung beizumessen ist.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen enterischen *E. coli* bedingten Krankheitsbilder beim Schwein.

Tabelle 1: Darmassoziierte *E. coli*-Infektionen des Schweines

<i>Erreger / Virulenzfaktor</i>	<i>Alter</i>	<i>Serogruppe</i>	<i>Darmtrakt</i>	<i>Funktionelle und morphologische Veränderungen</i>	<i>Erkrankung</i>
<i>E. coli</i> ETEC -LT (LT I/II) -ST (Sta/b) -F18ab/ac -F4 -F5 -F6 -F41	erste Lebenswoche / Absetzen	O8, O149, O147	Dünndarm	Enterotoxin-Rezeptor – Bindung → cAMP/cGMP Sekretion steigt → Flüssigkeitssekretion, bzw. sinkende Resorption	Koliruhr (Saugferkeldurchfall/ post-weaning-diarrhea)
<i>E. coli</i> STEC -F107 (F18ab) -Stx2e (-evtl. zusätzl. Enterotoxin)	10 Tage nach Absetzen/ z.T. Saugferkel	O138, O139, O141	Dünndarm	Toxin-Sekretion Stx2e → Ödeme; Ataxie	Kolienterotoxämie/ Ödemkrankheit (edema-disease) (evtl. zusätzlich Durchfall)
<i>E. coli</i> EPEC -bundle-forming Pili -Intimin	Jungtiere	O45	Dünndarm	Anheftung → ‘attaching and effacing lesions’ → Mikrovilliabrasion mit verminderter Flüssigkeitsresorption	Durchfälle
-Endotoxin	variabel			Massenhafte Vermehrung → Zerfall von Bakterien Freisetzung von Lipopolysaccharid → Schock	Koliendotoxinschock

2.2.2 Serotypen / Genotypen

Die serologische Differenzierung von *E. coli*-Stämmen, erfolgt durch die Identifizierung von Oberflächenantigenen. Es werden je nach ihrer Zugehörigkeit zur Bakterienzelle somatische (O), kapsuläre (K), flagelläre (H) und Fimbrienantigene (F) unterschieden. Es ist bekannt, dass die meisten Serogruppen zwar eng verbundene Genotypen aufweisen, jedoch nicht alle Mitglieder einer Serogruppe dieselben Virulenzgene oder die Expression gleicher Fimbrien zeigen (Nagy *et al.*, 1999). Die genetische Distanz innerhalb einer Serogruppe ist folglich sehr unterschiedlich. Die Serogruppen O157 und O138 zeigen beispielsweise eine große genetische Homogenität, während andere nur in geringem genetischen Zusammenhang zu stehen scheinen. Der Vergleich Ödemkrankheit auslösender Stämme verschiedener regionaler Herkunft ergab beispielsweise einen engen genetischen Zusammenhang dänischer und eine große Distanz zu Stämmen anderer

Länder (Nagy *et al.*, 1999). Alle Enterotoxine und der größte Teil der Fimbrien, ausgenommen F41 und F17 sind plasmiddeterminiert (Nagy und Fekete, 1999). Es kommt vor, dass bei Lagerung oder der Tierpassage von Stämmen Plasmide, die für Pathogenitätsfaktoren codieren, verloren gehen und somit der Serotyp nicht in jedem Fall mit der Ausstattung an Pathogenitätsfaktoren korreliert (Blanco *et al.*, 1997). Casey und Moon zeigten 1990, dass sowohl der Verlust des gesamten Plasmids oder nur die Deletion des entsprechenden Gens, in diesem Falle F5, von dem Plasmid für den Verlust des Virulenzfaktors verantwortlich zu sein scheint. Bei mit O157 infizierten Rindern gewannen Akiba *et al.* (2000) bereits nach einem Tag die ersten mutierten Isolate. Diese und ähnliche genetischen Veränderungen werden als clonal turnover bezeichnet.

Beim Schwein treten häufig die pathogenen Serotypen O149, O8, O147, O157 auf (Bertschinger *et al.*, 1992). Im Zusammenhang mit der PWD (post-weaning diarrhea) und der Ödemkrankheit wurden *E. coli* der Serotypen O138, O139, O141 isoliert, die in der Regel hämolytische Aktivität besitzen (Osek, 2000; Imberechts *et al.*, 1992).

2.2.3 Fimbrien

Die Anheftungsorgane werden als Fimbrien bezeichnet, die nach ihrer serologischen Aktivität in der Immunelektrophorese differenziert werden. Sie dienen dem Zweck, eine Anheftung der Bakterien an spezifische Rezeptoren in der Darmschleimhaut zu ermöglichen und so das Abschwemmen aus dem Darm zu verhindern.

Die Fimbrien F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 (Adhäsion) und F18 (F107, 2134P, 8813) treten häufig in Kombination miteinander und mit einem oder mehreren Toxinen auf (Mainil *et al.*, 1998). So werden häufig *E. coli* isoliert, die F4 mit den hitzestabilen und hitzelabilen Enterotoxinen, sowie F5 oder F6 mit den hitzestabilen Enterotoxinen kombiniert tragen.

E. coli, die mit den Fimbrien F5 / F6 / F41 ausgestattet sind, finden sich in erster Linie im distalen Jejunum und im Ileum (Bertschinger *et al.*, 1992), während F4 den gesamten Dünndarm besiedelt und ebenfalls oft im Ileum nachgewiesen werden kann (Jeyasingham *et al.*, 1999). Bertschinger und Pohlenz zeigten 1983, dass der Ödemkrankheit assoziierte

Stamm O139:K12(B):H1 bevorzugt im unteren Dünndarm ansiedelt und sich dort in Form von Einzelkolonien oder einer kontinuierlichen Schicht auf dem Darmepithel befindet.

Für einige der Fimbrien wurde eine genetische Resistenz des Wirtes nachgewiesen. So weisen bestimmte Schweinephänotypen eine F4 (K88) Resistenz auf, die rezessiv an die Nachkommen vererbt wird, während die Empfänglichkeit für F4 tragende *E. coli* einem dominantem Erbgang folgt (Gibbons *et al.*, 1977). Das F4-Fimbrium ist aus zwei unterschiedlichen antigenetischen Komponenten aufgebaut, so dass drei Antigenvarianten existieren, die nach der alten Nomenklatur als K88ab, K88ac und K88ad bezeichnet werden. Es wurde beobachtet, dass diese Varianten eine spezifische Affinität zu den Enterozyten verschiedener Schweinephänotypen aufweisen, wobei die Phänotypen A, B, C, D empfängliche und der Typ E ein resistenter Typ ist (Bijlsma *et al.*, 1982). Bertschinger *et al.* konnten 1993 ähnliche Verhältnisse bei der Empfänglichkeit von Schweinen für F107 tragende *E. coli* zeigen. Auch in diesem Fall wird die Resistenz gegenüber des F107 Fimbriums rezessiv auf die Nachkommen vererbt. Keines der resistenten Versuchstiere (ss bzw. bb) zeigte nach fünfmaliger oraler Applikation von $5 \cdot 10^5$ CFU des *E. coli* Stammes O139:K12:H1:F(107) pro Ferkel über zehn Tage Symptome der Ödemkrankheit, während bei den empfänglichen Tieren (Ss bzw. Bb/ SS bzw. BB) ein signifikanter Anteil der Tiere antimikrobieller Behandlung bedurfte, starb oder getötet werden mußte. Vögeli *et al.* (1997) sequenzierten das α -(1,2)-Fucosyltransferasegen von F18- *E. coli* empfänglichen und unempfindlichen Schweinen unterschiedlicher Rassen und fanden eine Mutation mit enger Kopplung zu dem Locus, der die Empfänglichkeit für die F18- *E. coli* Adhäsion codiert. Auf diese Weise wäre es möglich, wenn auch aufwendig, nicht resistente Phänotypen in einer Herde zu erkennen und zu eliminieren. Rippinger *et al.* (1995) wiesen an acht *E. coli* Stämmen zwei Antigenvarianten des F18 Fimbriums nach, wobei F107 zur Variante F18ab und 2134P sowie 8813 zur F18ac Variante zu zählen sind. Diese Anheftungsfaktoren verfügen also wie das F4 Fimbrium über eine gemeinsame Antigen determinante "a" und eine variantspezifische Determinante "b" oder "c". Die F18ab Variante steht im Verdacht, insbesondere bei den *E. coli* vorzukommen, die die Ödemkrankheit auslösen, während es sich bei den F18ac tragenden Isolaten offenbar um ETEC Stämme handelt. Rippinger *et al.* (1995) fanden allerdings ein enterotoxigenes Isolat, das F18ab exprimiert. Sarrazin und Bertschinger zeigten 1997, dass zwischen beiden möglichen F18 Varianten im Tierversuch eine Kreuzimmunität ausgebildet wird. Die Kolonisation des Darmtraktes mit

F18 tragenden Erregern führte zu einer signifikant erhöhten Menge an IgA im Serum und in Darmspülproben, wobei homologe IgA deutlicher anstiegen als heterologe. Dennoch erfolgte im Schwein keine zweite Kolonisation mit F18 tragenden *E. coli*, auch wenn in der Herde beide Varianten etabliert sind.

Eine bestehende F5 Altersresistenz beruht offensichtlich auf einer Konformationsänderung des spezifischen Glykoproteinrezeptors ab der siebten Lebenswoche, so dass eine Bindung F5 tragender *E. coli* aus sterischen Gründen nicht mehr möglich ist (Stamm und Sorg, 1993).

Für das ebenfalls neonatale Auftreten von F6 gab es lange Zeit keine Erklärung, da weder eine Veränderung der Rezeptorkonfiguration noch der Rezeptordichte des Dünndarms festgestellt werden konnte (Dean *et al.*, 1989). Dean zeigte 1990, dass das Auftreten von löslichen Rezeptoren neben den an die Enterozyten gekoppelten Rezeptoren im Darm von Ferkeln eine große Rolle spielt. So wurde beobachtet, dass sich im Darm von älteren Ferkeln lösliche Rezeptoren befinden, die bei Neonaten nur in Spuren vorhanden sind. Daraus kann geschlossen werden, dass F6 tragende *E. coli* durch diese löslichen Rezeptoren gebunden, abtransportiert und so eine Anheftung verhindert wird.

2.2.4 Toxine

ETEC-Stämme, die Verursacher der Koliruhr der Saugferkel und der PWD (post-weaning diarrhea) der Absetzferkel sind, tragen als Virulenzfaktoren das hitzestabile Toxin (ST) und/ oder das hitzelabile Toxin (LT). Beide Toxine werden aufgrund ihrer Wirkung im Darm des Wirtstieres als Enterotoxine bezeichnet.

ST ist ein nicht-immunogenes Protein, bei 100°C für 15 min stabil und wird nach seiner Löslichkeit in Methanol und seiner biologischen Aktivität in STa und STb eingeteilt.

StaP ist die porcine Variante des hitzestabilen Enterotoxin I und aktiviert die Guanylatcyclase in Enterozyten. Es kommt zu einem Anstieg von zyklischem Guanidinmonophosphat in der Zelle und über eine Hemmung des Na⁺-Cl⁻-Cotransports zu einer Verminderung der Wasser- und Elektrolyt-Resorption aus dem Darmlumen.

STb entfaltet seine pathogenen Wirkungen im Sinne einer Steigerung der Wasser- und Elektrolyt-Sekretion offensichtlich über ein zyklisches-Nucleotid unabhängiges System (Bertschinger *et al.*, 1992). Untersuchungen haben ergeben, dass Sulfatid einen funktionellen Rezeptor für STb darstellt und dass dieser im gesamten Darmtrakt vorkommt. Rousset *et al.* zeigten 1998, dass Stb an allen Darmabschnitten, sowie in Leber, Lunge, Milz und Niere pH-abhängige Bindungen eingeht. Als Wirkungsweise am Enterozyten wird die Anregung der Prostaglandin E2 Synthese über die Öffnung eines mit einem G-Protein verbundenen Kalziumkanals diskutiert. Die intrazellulär erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert eine Prostaglandin-Endoperoxidase-Synthetase. Auf diese Weise soll die Flüssigkeits- und Elektrolytaborption verringert werden (Nagy und Fekete, 1999 a). STb produzierende *E. coli* werden in erster Linie bei an Durchfall erkrankten Schweinen und nur seltener bei Mensch und Rind isoliert (Moon *et al.*, 1986). Beim Menschen sind Stb tragende Stämme jedoch offensichtlich nicht mit einem Durchfallgeschehen verbunden. Bei Saugferkeln werden sie in der ersten Lebenswoche nur sehr sporadisch und erst mit zunehmendem Alter häufiger gefunden (Beausoleil *et al.*, 1999). Andererseits werden oft Stämme isoliert, die das Toxin mit F4 und F6 kombiniert tragen, so dass diese durchaus den Darm von Saugferkeln kolonisieren können (Casey, 1999). Die Wirkung des hitzestabilen Enterotoxin II wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Einerseits ist es das am häufigsten beim Schwein isolierte Enterotoxin, wobei

Stb produzierende Stämme oft auch andere Enterotoxine exprimieren (Moon *et al.*, 1986). Andererseits zeigten Casey *et al.* 1998, dass der Stb tragende Klon keine höhere Durchfallinzidenz oder -stärke bei oraler Inokulation von Saugferkeln auslöste als der ursprüngliche Stb freie Stamm. Der StaP tragende Klon war allerdings in der Lage, eine schwere Durchfallssymptomatik auszulösen, die durch die Kombination der Gene beider Toxine nicht weiter verstärkt wurde.

LT zeigt sich bei nur 60°C 15 min lang stabil und wird in die Subtypen LT I und LT II eingeteilt, wobei LT I durch das Anticholera-Toxin neutralisierbar ist und hauptsächlich bei porcinen *E.coli*-Stämmen detektiert wird. Es handelt sich morphologisch um einen hochmolekularen Toxin-Komplex, der mit fünf B-Untereinheiten an Gangliosid-Rezeptoren der Darmschleimhaut bindet und dessen enzymatisch aktive A-Untereinheit die Adenylatcyclase aktiviert. Es kommt zu einem Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphates und damit zu einer Cl^- , Na^+ , HCO_3^- - Sekretion in das Darmlumen.

Keines der oben erwähnten Enterotoxine verursacht Läsionen an der Darmschleimhaut. Die Durchfälle sind wässrig, aber nicht blutig, so dass die Jungtiere in erster Linie an den Folgen einer dramatischen Dehydratation sterben.

Das Shigatoxin (Stx) ist ein Exotoxin und spielt als Ödemkrankheit verursachendes Agens in der Zeit kurz nach dem Absetzen eine Rolle. Es zeigt eine antigene Kreuzreaktion zu *Shigella dysenteriae* Typ1 Toxin und wird in Stx1, Stx2 und Stx3 eingeteilt, wobei Stx1 im Gegensatz zu Stx2 durch Shiga-Toxin-Antiserum neutralisierbar ist. Das die Ödemkrankheit auslösende Toxin ist hitzestabiler als Stx2 und wird als Stx2 Variante (Stx2v) oder Stx2-edema disease (Stx2e) bezeichnet. Aufgrund seiner destruktiven Wirkung auf Verozellen wurde Stx auch Verotoxin genannt (VT I, VT II, VT IIv). Der Mechanismus der Ödemkrankheit beginnt mit der Freisetzung von Stx2e, nachdem sich der entsprechende Stamm vermehrt und den Dünndarm besiedelt hat. Es kommt zu einer spezifischen Bindung der B-Untereinheit des Toxins an einen Endothel-Rezeptor. Im Falle des Stx2e kann es sich dabei um Globotetraosylceramid (Fb_4), Galactosylglobosid (Fb_5) oder Globotriosylceramid (Gb_3) handeln. Die A-Untereinheit besitzt eine RNA-N-Glycosidase-Aktivität und ist in der Lage, einen Adenosinrest spezifisch aus der 28S-RNA des Wirtes zu entfernen (Imberechts *et al.* 1992). Auf diese Weise wird die Proteinbiosynthese gehemmt, und es kommt zur Entgleisung des Zellmetabolismus.

Bereits zwei bis vierzehn Tage nach einer experimentellen Infektion mit einem STEC Stamm zeigen sich die ersten ultrastrukturellen Läsionen an den intestinalen Arteriolen (Methiyapun *et al.*, 1984; Kausche *et al.*, 1992), aber auch die ersten Symptome der Enterotoxämie (Bertschinger und Pohlenz, 1983). Die so entstandenen Endotheldefekte führen zu generalisierten Ödemen, die im Bereich des Zentralen Nervensystems (ZNS) neurologische Symptome verursachen. Stx2e wurde aus diesem Grund ehemals als Vasotoxin oder Neurotoxin bezeichnet. Häufig findet sich Stx2e in Kombination mit F18. Dieses Fimbrium ist ebenfalls maßgeblich an der Entstehung der PWD beteiligt. Es tritt offensichtlich nicht bei jungen Ferkeln auf, so dass Erkrankungen, die durch F18 tragende *E. coli* verursacht werden, ihren Verlauf erst nach dem Absetzen zeigen.

2.2.5 Mechanismen des Gentransfers

Bakterien sind in der Lage, sich schnell an variierende Umweltbedingungen, wie fremde Wirtssysteme oder klimatische Faktoren, anzupassen. Die Evolution der Prokaryoten verläuft dadurch in schnellen Schritten. Die Weitergabe genetischer Information ist eine Voraussetzung der bakteriellen Evolution und kann auf verschiedenen Wegen stattfinden. Einerseits gibt es die Möglichkeit genetisches Material nach Mutation, Rekombination von Genen oder die Veränderung von Genen durch Insertionssequenzen oder Transposons (,movable genetic elements') mittels des vertikalen Gentransfers (Maiden, 1993) auf die nächste Bakteriengeneration weiterzugeben. Bakteriengattungen, die genetisches Material in erster Linie vertikal übertragen, zeigen in der Regel eine geringe genetische Vielfalt in Form stabiler Klone. So eine Population, die über lange Zeit mehr oder weniger unverändert existieren kann, bezeichnet man als klonale Population.

Einen wesentlich schnelleren Schritt stellt jedoch die horizontale Übertragung genetischen Materials dar, wobei bei prokaryotischen Zellen die Übertragung von DNA-Segmenten von einem Gendonor auf einen Genakzeptor verstanden wird. Die Übertragung genetischen Materials ist dabei sowohl bei artverwandten als auch nicht-artverwandten Organismen möglich. Die bekanntesten Formen sind die Konjugation, die Transformation und die Transduktion mittels Bakteriophagen. Sie führen in der Regel nach der Rekombination von Genen anderer Spezies in der Akzeptorzelle zu einer Mosaikstruktur von Genen. Dabei wird die klonale Struktur einer Bakterienpopulation von Rekombinationen horizontal übertragener Gene beeinflusst und kann bei überwiegend horizontal stattfindendem Gentransfer nicht aufrechterhalten werden. Populationen mit einem großen Anteil solcher Rekombinationsereignisse werden als panmiktisch bezeichnet (Maynard Smith *et al.* 1992, 1993). Ein Maß für den Grad der Rekombinationen in einer Population ist die Homoplasie so genannter ,housekeeping' Gene mit einer geringen genetischen Drift (Maynard Smith und Smith, 1998).

Der horizontale Gentransfer mittels Konjugation setzt eine Verschmelzung zweier Bakterien voraus, von denen einer einen Fertilitätsfaktor (F+) tragen muss (,männliches' Bakterium), während dem ,weiblichen' Partner dieser Faktor fehlt (F-). Beim direkten Kontakt findet im klassischen Fall der Gentransfer ausschließlich in eine Richtung statt.

Mergeay *et al.* zeigten jedoch bereits 1987, dass das IncP1 Plasmid pULB113 den Fluß genetischen Materials sowohl von der Donor- zur Akzeptorzelle als auch in die entgegengesetzte Richtung vermittelt. *E. coli* ist zum Zweck der Konjugation mit einem Pilus ausgestattet, der von einem konjugativen Plasmid codiert wird. Dieser Pilus wird darüber hinaus auch bei der Transduktion von einigen Phagen als Rezeptor zur Anheftung an die Bakterienzelle genutzt. Bei der Konjugation werden in der Regel Plasmide weitergegeben. Manche Bakterien, wie einige *E. coli* Stämme, sind jedoch in der Lage, auch chromosomale Gensequenzen auszutauschen. Diese werden gemeinhin als Hfr-Stämme (‘high frequency recombination’) bezeichnet.

Transformation ist der freie Austausch ‚nackter‘ DNA und setzt die Bereitschaft eines Bakteriums voraus, genetisches Material aufzunehmen. Dieser Mechanismus wurde bereits 1928 von Griffith entdeckt. Einige Bakterien, wie *B. subtilis* oder *H. influenzae* sind dazu natürlicherweise in der Lage. Andere Bakterien werden erst durch äußere Einflüsse, wie Calciumchlorid oder Elektroporation empfänglich gemacht. Diese so genannte Kompetenz ist sowohl vom physiologischen Zustand als auch von der Wachstumsphase der Zellen abhängig. Einerseits ist während des kompetenten Stadiums die Zelloberfläche porös, andererseits müssen zur Aufnahme und Prozessierung der DNA bestimmte Enzyme, wie DNA-Bindungsproteine, Autolysine und Nucleasen, aktiv sein. Ob die DNA als Einzelstrang oder als Doppelstrang aufgenommen wird, ist ebenso wie die Länge des aufgenommenen Fragmentes von der Bakteriengattung abhängig. Oft degradiert die DNA jedoch nach der Aufnahme in die Akzeptorzelle. So wiesen Adam *et al.* 1999 nur eine geringe Frequenz der gelungenen Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* DNA in Zelllysaten auf *E. coli* nach. Unter optimalen Reaktionsbedingungen wurden etwa 50 erfolgreiche Transformationen pro Mikrogramm DNA gemessen.

Bei der Transduktion wird bakterielle DNA in einen Phagen impliziert, der diese nach der Infektion einer anderen Bakterienzelle auf diese überträgt. λ -Phagen beispielsweise integrieren dazu ihr gesamtes Genom als Prophage in ein bakterielles Chromosom (Miller 1998). Bei der Transduktion kann man zwischen unspezifischer und spezifischer Transduktion unterscheiden. Im Falle der unspezifischen Transduktion wird DNA der Wirtszelle entweder zusätzlich oder anstelle des Phagengenoms in den Viruspartikel verpackt. Bei einigen Bakteriophagen kann auf diese Weise DNA in einer Größenordnung von ca. 100 kb übertragen werden, was etwa 2,5 % des Genoms von *E. coli*, in einigen

Fällen (PBS1) bis zu 8 %, entsprechen kann. So können sogar Gengruppen übertragen werden (Singer und Berg, 1992). Bei einigen Bakteriophagen, wie beispielsweise Mu-Phagen, erfolgt die Transduktion des Phagen-genoms immer in Zusammenhang mit 1-2 kb Wirts-DNA und wird an beliebiger Stelle ins Bakteriengenom inseriert (Brock *et al.*, 1994). Bei der spezifischen Transduktion werden die Abschnitte des Wirtsgenoms mit der Phagen-DNA homolog in das Genom der infizierten Zelle inseriert. So kann der Austausch eines defekten mit einem funktionstüchtigen Gen erfolgen.

An die beschriebenen Vorgänge schließt sich in der Empfängerzelle die DNA-Rekombination an. Im Falle der Plasmide entstehen beispielsweise R-Plasmide, die durch Mehrfachresistenzen ausgezeichnet sein können. Es können drei Arten der Rekombination unterschieden werden: generelle, sequenzspezifische und illegitime Rekombination. Bei der generellen Rekombination findet eine neue Paarung der DNA entlang homologer Abschnitte statt. Beim Austausch eines Doppelstranges erfolgt eine neue Kombination von Genen im Genom oder auf einem Plasmid. Die sequenzspezifische Rekombination findet an spezifischen Erkennungssequenzen statt und erfolgt somit an einer bestimmten Stelle. Wenn beispielsweise das Phagen-genom eine homologe Sequenz zum Bakteriengenom aufweist, erfolgt dort die Insertion. Eine illegitime Rekombination liegt dann vor, wenn sie von Homologien spezifischer oder unspezifischer Erkennungssequenzen für die Insertion von DNA, wie beispielsweise bei Mu-Phagen, Insertionssequenzen und Transposons, unabhängig ist.

Die Relevanz des horizontalen Gentransfers liegt in der schnellen Übertragung, auch über die Artenbarriere hinaus, von genetischem Material, das für Merkmale codiert, die für die Akzeptorzelle einen Vorteil oder für den Wirtsorganismus einen Nachteil bedeutet. Das bekannteste Phänomen ist sicherlich die Übermittlung von R-Plasmiden, die der Akzeptorzelle das Merkmal einer antibiotischen Resistenz ermöglichen. So zeigte Kandov bereits 1979 an *E. coli* Stämmen von Vögeln, dass 37 % der untersuchten Stämme über eine transmissible Antibiotikaresistenz verfügten. Diese war zum Teil in Bezug auf mehrere Antibiotika vorhanden („multi-drug resistance“), zeigte sich aber insbesondere als Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Sulfathiazol und Tetrazyklin. Mittlerweile belegen eine Reihe von Untersuchungen den Transfer antibiotischer Resistenzen zwischen Bakterien. Yan *et al.* wiesen beispielsweise 2001 in einem *S. enterica* serovar Hadar Stamm, der bei einem Patienten mit einer Wundinfektion in einem

Universitätskrankenhaus in Taiwan isoliert wurde, erstmalig das Plasmid blaCMY-2, das für eine Ceftriaxon spaltende Lactamase encodiert, nach (Yan *et al.*, 2002). Der Vergleich mit im Vorjahr isolierten *E. coli* Bakterien ergab das identische Plasmid in einem *E. coli* Stamm, so dass die Autoren davon ausgehen, dass zwischen den unterschiedlichen Enterobakterienspezies ein Transfer stattgefunden hat. In diesem Falle ist der beobachtete Hospitalismus besonders dramatisch, da Cephalosporine Breitspektrum-Antibiotika sind und für eine Vielzahl an Indikationen in der Infektionsmedizin zum Einsatz kommen.

Aber auch bezüglich anderer Plasmide ergeben sich bei Salmonellen und *E. coli*, die vor etwa 140 Mio. Jahren vermutlich einen gemeinsamen Ursprung hatten, Übereinstimmungen. Boyd und Hartl zeigten 1996, dass von sechs phylogenetischen Salmonellagruppen in vier homologen Sequenzen des F-like Plasmids zum Fertilitätsfaktor codierenden F-Plasmid von *E. coli* vorhanden waren. Zum Teil gab es eine völlige Übereinstimmung aller untersuchten Gensequenzen des Plasmids, so dass die Konjugation bei der evolutionären Entwicklung beider Spezies eine große Rolle gespielt haben könnte.

In vitro Studien zeigten bezüglich ETEC eine sehr heterogene Population der enterotoxigenen (Ent) Plasmide (Harnett und Gyles, 1985; Urbina *et al.*, 1989). So befanden sich bei zwei von drei Colicin produzierenden Stämmen die Gene für F5, ST und Colicin auf einem Plasmid, während der andere Stamm das F5 Gen auf einem unabhängigen Plasmid trug, als das für die Gene der STa und Colicin Produktion. Von den beiden zuerst genannten Stämmen übertrug einer das Genmaterial für eine Tetrazyklin Resistenz, sowie für STa und ST (Maus inaktiv). Der andere übertrug nur STa. Das zeigt in eindrucksvoller Weise die Diversität der Ent Plasmide und die Unterschiede der Genübertragung (Harnett und Gyles, 1985). Schon 1981 wies Franklin *et al.* an 22 Isolaten nach, dass die Gensequenzen für F4, ST und LT beim Serotyp O 149 auf unterschiedlichen Plasmiden liegen, so dass ein völlig unabhängiger Transfer möglich ist. Danbara *et al.* zeigten, dass der Transfer von Ent Plasmiden auf nontoxigene *E. coli* unabhängig vom Serotyp des Akzeptorstammes ist. So war der erfolgreiche Transfer vier verschiedener Ent Plasmide, die entweder für LT, ST oder beide Faktoren codierten, auf nontoxigene Stämme eines variablen Serotyps genauso möglich, wie die Übertragung auf Serogruppen, die üblicherweise ETEC Stämme beinhalten (Danbara *et al.*, 1986). Scotland,

Day und Rowe zeigten 1981, dass nach dem Transfer dreier verschiedener Ent Plasmide für LT, ST, sowie LT und ST, die alle zusätzlich für eine Antibiotikaresistenz codierten, bei allen Akzeptorisolaten, mit Ausnahme von einem, auch tatsächlich eine Expression der übertragenen Faktoren stattfand.

Franklin und Mollby wiesen 1983 auch den Transfer und die Rekombination von Genen für Antibiotika-Resistenz und STa von O 149 auf den apathogenen *E. coli* Stamm K12 nach und vermuteten den gleichen Vorgang in hoher Frequenz in vivo unter einem vorherrschenden antibiotischen Selektionsdruck. Klimuszko *et al.* zeigten 1989 den in vivo Transfer des Hly Plasmides von nativen pathogenen und enterotoxischen *E. coli* auf autochtone *E. coli* im Darm von Schweinen. Diese Übertragung wurde allerdings nur festgestellt, wenn der Donor das Plasmid in hoher Frequenz überträgt und zuvor den Darm kolonisiert hat.

Der Transfer des VT Gens von aus an der Ödemkrankheit leidenden Schweinen isolierten *E. coli* O 141:K85, 88 auf apathogene *E. coli* K12 verursachte im darauf folgenden Tierversuch nach der Verabreichung des Akzeptorstammes an Schweine die klinischen und pathologischen Symptome der Ödemkrankheit (Smith, Green und Parsell, 1983). Sekizaki *et al.* zeigten 1984, dass die Übertragung des geklonten ST Genes sogar eine höhere ST Produktion des rekombinanten Plasmides ergibt.

So könnte durch horizontale Übertragung genetischen Materials die Toxizität von pathogenen Stämmen in kurzer Zeit erhöht werden.

2.3. Probiotika

2.3.1 Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe

1974 wurde von Probiotika erstmalig im Sinne von Futterzusatzstoffen gesprochen. Zu der Zeit war der Begriff ‚Probiotikum‘ nicht nur auf Mikroorganismen bezogen, sondern auch auf Stoffe, sofern sie dazu beitragen, das intestinale mikrobielle Gleichgewicht aufrechtzuerhalten (Parker, 1974). Heute sind eine Vielzahl von Mikroorganismen unter diesem Begriff zusammengefasst; Pilze, wie *Saccharomyces cerevisiae*, Bakterien, wie Laktobazillen, Enterokokken, Pediokokken und *Bacillus*-Stämme.

Eine Vielzahl von Mechanismen wird für die Wirkung von Probiotika diskutiert. Die Aggregation von Probiotika und unerwünschten Bakterien sowie ein gemeinsames Abschwemmen aus dem Darm, die Implizierung einer Immunantwort des Wirtes auf Antigene des Probiotikums und eine damit erhöhte Infektionsabwehr, die Bildung von Bakteriozinen, metabolischen Endprodukten oder antibiotikaähnlichen Substanzen zur Hemmung von Erregern oder derer Adhäsion an die Darmschleimhaut, die Bindung der Probiotika an die Darmwand und die so erfolgte kompetitive Verdrängung von Erregern, sowie die Nahrungskompetition werden in Betracht gezogen (Parker, 1974; Naclerio *et al.*, 1993; Steward *et al.*, 1995; McCracken und Gaskins, 1999). So zeigten Blomberg *et al.* bereits 1993, dass *Lactobacillus fermentum* in vitro die Adhäsion F4ab und ac tragender *E. coli* an die Schleimschicht über porcinen Ileumenterozyten zu ca. 50% hemmen kann. Verantwortlich für diesen Effekt ist möglicherweise eine proteinartige Komponente, die die F4-Rezeptoren durch chemische oder sterische Effekte blockiert. Zimmermann *et al.* zeigten 1997, dass drei unterschiedliche *Lactobacillus*-Spezies in vitro nicht nur die Aktivität von Makrophagen bzw. Monozyten und natural-killer-cells, sondern auch die T-Zell-Aktivität in peripheren Blutproben in unterschiedlichem Maße erhöhten. Die resultierenden Wirkungen können ebenso vielfältig sein, sind jedoch zum Teil recht umstritten. Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass bei Zulage von *Bacillus* Präparaten Enterobakterien, insbesondere *E. coli* gehemmt oder deren Ausscheidung vermindert, Leistungsparameter, wie Lebendmassezunahme und Futteraufnahme positiv beeinflusst, die Durchfallhäufigkeit gesenkt und das Wachstum von Hauptflorakomponenten, wie Bifidobakterien und Laktobazillen, selektiv gefördert

werden (Kirchgessner *et al.*, 1993). Zani *et al.* zeigten 1998 im Tierversuch an Schweinen eine 50%ige Verminderung der Durchfallhäufigkeit im Vergleich zu den Kontrolltieren. Auch der Futterumsatz und die Gewichtszunahme waren bei den Tieren mit *B.cereus* Zulage signifikant erhöht. Klein und Schmidts beobachteten 1997 nach 28 tägiger *B.cereus* Zulage signifikante Zunahmen hinsichtlich der jejunalen Mukosaoberfläche, Zottenlänge und Kryptentiefe von Absetzferkeln. Scheuermann wies 1993 eine verminderte Ammoniakbelastung des Blutes, sowie eine signifikante Verringerung der N-Ausscheidung von *Bacillus* CIP5832 supplementierten Schweinen nach und interpretierte die Befunde als positiven Effekt des Probiotikums auf die N-Balance. Bei Ratten konnte nach Verabreichung eines "Cocktails" aus insgesamt fünf probiotischen Mikroorganismen in Leber und Serum ein Cholesterolsenkender Effekt nachgewiesen werden (Fukushima und Nakano, 1995). Bei Minipigs war nach Zulage von Laktobazillen dieser Effekt weniger deutlich, dafür ist ein Abfall der prokarzinogenen β -Glukuronidase und Azoreduktase im Kot nachgewiesen worden (Holzapfel *et al.*, 1997). Ein anderer Teil der Veröffentlichungen weist keine Ergebnisse hinsichtlich einer Probiotikumwirkung vor (De Cupere *et al.*, 1992; Spriet *et al.*, 1987).

2.3.2 *Bacillus cereus*

Bacillus Spezies sind grampositive, fakultativ anaerobe sporenbildende Stäbchen. *Bacillus cereus* var. *toyoi* ist ein Bodenbakterium, das seit über 20 Jahren in Europa als Probiotikum eingesetzt wird. Es keimt in Wachstumsmedien unter optimalen Bedingungen nach 10 Minuten und nach oraler Aufnahme im Darmtrakt schnell aus und führt beim Ferkel zu einer Verringerung der Wachstumskapazitäten von Enterobacteriaceen vor dem Absetzen (Jadamus *et al.*, 2000), bzw. zu einer Verringerung der *E. coli* Keimzahlen in den vorderen Verdauungsabschnitten bei abgesetzten Ferkeln (Gedek *et al.*, 1993). Bei guten hygienischen Haltungsbedingungen können allerdings keine Verbesserungen der Gesundheit oder der Kondition festgestellt werden (Fuller, 1999). Auch nach oraler Infektion mit dem hämolysinbildenden *E. coli* Stamm O141 K85ab ist weder ein positiver Effekt auf das Krankheitsbild der Enterotoxämie im Sinne von Mortalität, Durchfällen und nervöser Symptomatik, noch auf die Exkretion hämolysinbildender *E. coli* festgestellt worden (De Cupere *et al.*, 1992). Je älter die Tiere sind, desto geringgradiger erscheint der positive Effekt. Dennoch gibt die Literatur starke

Hinweise auf eine Verringerung der durch *E. coli* verursachten Ferkeldurchfälle. Einerseits wird die Stimulation lokaler Abwehrmechanismen diskutiert. Thelen (1997) wies unter anderem einen Anstieg der Leukozyten, insbesondere der neutrophilen Granulozyten im Blut bei *B. cereus* var. *toyoi* Zuzug auf und interpretierte dieses Phänomen als Anpassungsreaktion des Wirtes auf das körperfremde Bodenbakterium. Hofmann, Klein und Behrens verzeichneten 1997 bei Zuzug von *B. cereus* einen kurzfristigen Anstieg der IgM und der sekretorischen IgA in den Darmsekreten. Die sIgA erwiesen sich zum Teil als antigenspezifisch. Sie reagierten im ELISA sowohl gegen *B. cereus* selbst, als auch gegen *E. coli* und gegen *Serpulina hyodysenteriae*. Dieses Phänomen könnte eine Erklärungsgrundlage für eine reduzierte Diarrhoeinzidenz bei Einsatz von *B. cereus* sein.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Gewinnung bakterieller Nukleinsäuren

Für die Untersuchung von DNA oder RNA zur Identifizierung oder Klassifikation von Bakterien, bzw. zur Beurteilung ihrer biologischen Aktivität, müssen zunächst die Gesamtnukleinsäuren aus der Bakterienzelle extrahiert werden. In der Literatur finden sich zahlreiche Methoden des Zellaufschlusses und der Nukleinsäureisolierung. Die Wahl der Methode ist in erster Linie von der Art des eingesetzten Materials und der zu isolierenden Nukleinsäure und auch der Notwendigkeit, RNAsen und DNAsen zu inaktivieren, abhängig.

Insbesondere komplexes Probenmaterial, wie Digesta erschwert die Lyse der Bakterien. Es stehen verschiedene Trennprinzipien zur Verfügung: biologische (in erster Linie enzymatische), chemische und physikalische, die oft auch in Kombination angewandt werden.

Lysozym dient dem Abbau gramnegativer Zellwände. Bakterielle Protoplasmen werden mit SDS, das auch RNAsen inaktiviert, lysiert und Proteine mittels Guanidinthiocyanat denaturiert. Detergentien, wie N-Lauryl-Sarkosin oder SDS, dienen unter Zuhilfenahme mechanischer Disruption, wie Vortexen oder dem Einsatz von Glassbeads dem Aufschluß bakterieller Membranen und grampositiver Zellwände. Im Anschluß daran ist mittels Phenol die Entfernung von Proteinen aus dem Molekülgemisch möglich, da Phenol aufgrund seiner Fähigkeit, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zu Aminosäureseitenketten einzugehen, Protein-Nukleinsäure-Komplexe dissoziiert. Bei saurem pH geht auch DNA in die Phenolphase über, so dass hier mit Tris-HCl/EDTA-gepuffertem (pH 7,5-8,0) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gearbeitet werden sollte. Chloroform wirkt zusätzlich denaturierend und erleichtert obendrein die Phasentrennung, wobei Isoamylalkohol das Schäumen und die Ausbildung einer intensiven Interphase erschwert. Nach dem Zentrifugieren befinden sich die Nukleinsäuren im wässrigen Überstand, der durch den Einsatz von Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) von Protein- und Phenolresten gereinigt wird. Die Nukleinsäuren fallen in Gegenwart von Salz, oft Natriumacetat oder Natriumchlorid, in Alkohol spontan aus und können durch Zentrifugieren gefällt werden. Isopropanol fällt Nukleinsäuren sehr

effektiv, so dass ein Verhältnis von Probenlösung zu Alkohol von 0,6 - 0,8 ausreichend ist. Ethanol, als 70%ige Lösung eingesetzt, ist weniger effektiv, entzieht dem Nukleinsäure-Pellet aber mehr Wasser, so dass das Lösen später leichter fallen kann, verdampft schneller und entfernt Isopropanolreste, so dass nach dem Trocknen keine Rückstände die Nukleinsäuren verunreinigen (Schröder, 1999).

2.4.2 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur selektiven *in vitro* Amplifikation einer spezifischen DNA-Region und eine Nachahmung der zellulären DNA-Replikation. Sie wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und führte zu einer Revolution der Biotechnologie. Erstmals konnten von bestimmten Nucleotidsequenzen enzymatisch millionenfach Kopien hergestellt werden.

Nach thermischer Denaturierung der doppelsträngigen Proben-DNA synthetisiert die DNA-Polymerase, ausgehend von einem Startermolekül entlang jedes Matrizenstranges nach dem Vorbild der semikonservativen Replikation einen neuen, komplementären DNA-Strang.

Bei der PCR ist es aufgrund der initialen Hitzewirkung bei der Denaturierung des DNA-Doppelstranges sinnvoll, eine hitzestabile Polymerase zu verwenden. Hitzelabile *E. coli*-Enzyme konnten erst nach der thermischen Denaturierung dem Reaktionsansatz zugefügt werden, was die Möglichkeit einer Kontamination mit Fremd-DNA stark erhöhte. Aus diesem Grund wird häufig die thermostabile Taq-Polymerase, isoliert aus *Thermus aquaticus*, einem in heißen Quellen wachsenden Bakterium, verwendet. Sie besitzt ein Temperaturoptimum von 74 °C, ein pH-Optimum von 8,0 und eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität, ist aber nicht in der Lage, fehlerhafte Sequenzen in 3'-5'-Richtung zu korrigieren. Ihre DNA-Syntheserate liegt bei ca. 2800 Nucleotiden pro Minute. Es sind allerdings mittlerweile thermostabilere Polymerasen erhältlich, die zusätzlich über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität verfügen. Diese Enzyme haben allerdings den Nachteil, dass sie mitunter einzelsträngige Primer korrigieren und eine wesentlich geringere Syntheserate (ca. 550 Nucleotide pro Minute) aufweisen als die Taq-Polymerase. Einige unter ihnen zeigen eine Reverse-Transkriptase-Aktivität und können so vielseitiger eingesetzt werden. Die Fehlerrate bei Polymerasen mit Korrektur (Proofreading)-Aktivität liegt etwa bei 10^{-6} .

je eingebauter Base, bei der Taq-Polymerase um den Faktor 10 höher, wobei die Zusammensetzung des PCR-Puffers eine Rolle spielen kann (Mülhardt, 1999). Das Enzym wird gewöhnlich in einer Konzentration von 1 unit (U) pro 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Reihe natürlich in Proben vorkommender oder im Laufe der Extraktion anfallender Substanzen die Aktivität der Polymerase hemmen (Rossen *et al.*, 1992). Insbesondere Medienreste, Phenol, SDS, Lysozym, EDTA, Guanidinthiocyanat, Ethanol und Isopropanol sollten nach der Kultivierung von Mikroorganismen oder Zellkulturen und der Extraktion der DNA aus den Proben entfernt worden sein.

Da die Polymerase nicht zur de-novo Synthese von DNA fähig ist, muß ein DNA-Molekül mit freiem 3'-OH-Ende den Start der Enzymreaktion ermöglichen. Es handelt sich hierbei um ein DNA-Oligonucleotid (Primer), das dem Reaktionsansatz zugegeben werden muß. *In vivo* wird ein Primer zu Beginn eines zellulären Replikationszyklus von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase entlang des DNA-Einzelstranges gebildet. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann die dazwischenliegende Sequenz gezielt vervielfältigt werden. Die Primerlänge liegt häufig zwischen 18 bis 30 Basen mit einem Guanidin-Cytosin-Gehalt von 40 – 60 %. Zur Vermeidung von Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen sollten nicht mehr als vier gleiche Basen aufeinanderfolgen (Mülhardt, 1999). Die Sequenz sollte so gewählt sein, dass die Primer weder zu sich selbst noch untereinander komplementär sind, um die Bildung von Primerdimeren und Sekundärstrukturen auszuschließen. Sie sollte möglichst spezifisch zur Zielsequenz sein, um die Bildung unspezifischer Amplifikate und Artefakte zu vermeiden. Es hat sich als begünstigend auf die Bindung und die Elongation herausgestellt, am 3'-Ende des Primers maximal drei G oder C zu plazieren.

Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer ist die Temperatur, bei der 50 % der Primermoleküle nicht mehr an die Zielsequenz binden. Sie ist bei Primern mit einer Länge um 20 Basen in erster Linie vom G-C-Gehalt abhängig und kann nach folgender Formel errechnet werden:

$$T_m = 4 * (G + C) + 2 * (A + T).$$

Bei längeren Primern sind neben dem G-C-Gehalt die Größe des zu amplifizierenden Fragmentes, die Anzahl monovalenter Kationen im verwendeten Puffer und der Anteil der Mismatches, also der fehlgepaarten Basen, von Interesse. Es wird außerdem beobachtet, dass sich benachbarte Basen gegenseitig beeinflussen. Die Hybridbildung von Primer und Zielsequenz wird als Annealing bezeichnet. Die optimale Annealingtemperatur eines jeden Primers liegt etwa 5 °C – 10 °C unterhalb des T_m -Wertes (Mülhardt, 1999; Scheinert, 1997).

Das pH-Optimum der Taq-Polymerase liegt bei einem pH von über 8,0, so dass in erster Linie ein Tris-Puffer von pH 8,5 oder 9,0 Verwendung findet.

Für die Synthese des Amplifikates benötigt die Polymerase von jeder Base die Desoxyribo-Nucleosidtriphosphate. Diese werden dem Reaktionsansatz im Überschuß, meist in einer Konzentration von 200 µM je dNTP zugefügt.

Als Salze werden oft bis zu 50 mM KCl oder bis zu 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verwendet. Das Vorhandensein von NaCl hemmt die Aktivität der Polymerase.

Für die sterische Stabilisierung der Nucleotide bei Primerannealing, Denaturierung der DNA-Stränge und Elongation der Primer durch die Polymerase ist Mg^{2+} vonnöten. Es beeinflusst auf diese Weise die Fehlerrate, die Produktspezifität und die Bildung von Primerdimeren. Die eingesetzte Konzentration liegt bei 0,5 – 2,5 mM Mg^{2+} , wobei zu beachten ist, dass Nucleotide, Primer und EDTA Mg^{2+} binden.

Einige Firmen bieten gebrauchsfertige Kits an, die das Herstellen eines PCR-Ansatzes erheblich erleichtern können. Im Folgenden soll beispielhaft das Hot Star Taq Master Mix Kit der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland vorgestellt werden. Dessen Vorteil besteht im Wesentlichen darin, dass in Form einer Gebrauchslösung eine hitzestabile Polymerase und 400 µM eins jeden dNTPs in einem PCR-Puffer (Tris Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,7) mit 3 mM MgCl_2 vorliegen. Diese Lösung ist zweifach konzentriert und wird mit der gewünschten Menge eines jeden Primers und mit Wasser versetzt. Durch das Einsparen einer Vielzahl von Pipettierschritten sinkt in großem Maße die Kontaminationsgefahr.

Zur korrekten Einhaltung der wechselnden Temperaturen werden programmierbare Thermocycler benutzt, wobei die neueren Fabrikate neben einer Kammer mit einem Heizblock und einem Display mit Temperaturanzeige ausserdem einen Heizdeckel besitzen, was die Kondenswasserbildung und damit verbundene Evaporationsverluste verhindert. Ohne Heizdeckel muß jeder Reaktionsansatz mit Paraffinöl überschichtet werden, was nicht nur eine Quelle der Kontamination, sondern auch ein Problem bei der Weiterverarbeitung des Produktes sein kann.

Ein PCR-Zyklus besteht aus Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94 °C für in der Regel 30 bis 60 Sekunden, Anlagerung (Annealing) der Primer bei der Annealingtemperatur für häufig 30 bis 60 Sekunden und nachfolgender Elongation der Primer durch die Taq-Polymerase bei 72 °C, oft für 30 bis 120 Sekunden. Diese PCR-Standardprozedur wiederholt sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Probe und der Menge an Ziel-DNA (Template) etwa 25 – 35 Mal. Vor dem ersten Zyklus wird die Template-DNA einmalig für 5 min bis 15 min bei 95 °C denaturiert. Nach Abschluß des letzten Zyklus` wird oft ein weiterer Elongationsschritt für 5 bis 10 Minuten durchgeführt, um es der Taq-Polymerase zu ermöglichen, die Arbeit an allen Strängen abzuschließen und so die Menge an vollständigem Amplifikat zu erhöhen. Nach Abschluß der PCR wird zur Unterbrechung der enzymatischen Reaktion das Gemisch auf 4 °C gekühlt und so bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Bezüglich der Wahl der Zyklusanzahl ist zu bedenken, dass es bei ca. 0,3 bis 1 pM Produkt zu einem "Plateau" kommen kann (Mülhardt, 1999). So fallen neben einer Sättigung mit Produkt immer mehr Nebenprodukte der PCR-Reaktion, wie Pyrophosphat an. Gleichzeitig nimmt die Konzentration an dNTP und intakter Polymerase ab, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt. Es kommt verstärkt zur Primerdimerbildung, zu Fehlhybridisierungen und zur Produktion unspezifischer Nucleotide, so dass der Hintergrund zunimmt, nicht aber die Menge an spezifischem Produkt.

Eine Möglichkeit, bei einer geringen Menge an Template-DNA die Produktmenge zu erhöhen, ist die sogenannte ‚Touchup‘ PCR. Vor den eigentlichen Zyklen mit konstanter Annealingtemperatur, wird eine gewisse Zahl Zyklen gestellt, in der die Temperatur zum Primerannealing Zyklus für Zyklus von einem sehr niedrigen Temperaturniveau bis zur gewünschten Annealingtemperatur erhöht wird. Der Effekt besteht darin, dass die Stringenz mit der Primer an die Template-DNA binden in den Zyklen mit geringer

Temperatur gesenkt wird. Im ersten Teil der "Touchup" PCR wird auf Kosten der Spezifität eine große Menge an Produkt gebildet.

Bei Produkten, die eine sehr exakte Genauigkeit der Amplifikation erfordern, sollte, insbesondere bei ausreichendem Templategehalt, eine ‚Touchdown‘ PCR in Betracht gezogen werden. Durch anfänglich hohe Annealingtemperaturen wird eine sehr exakte Primer-Templatebindung ermöglicht. Durch sinkende Annealingtemperaturen in den folgenden Zyklen wird die Vermehrung der zuvor gebildeten spezifischen Produkte erreicht.

Theoretisch ist es möglich, ein Molekül Template-DNA bis zur Nachweisbarkeit zu vermehren. Problematisch bleibt jedoch die Tatsache, dass mit steigender Zyklusanzahl die Bildung unspezifischer Produkte bis hin zum völligen Überdecken der gesuchten Bande auf Agarosegelen zunimmt.

2.4.3 Multiplex PCR

Diese pragmatische Erweiterung der PCR Methodik wurde erstmalig 1988 von Chamberlain et al. durchgeführt.

Die Multiplex PCR versucht, an einer eingesetzten Probe mehrere verschiedene Amplifikate gleichzeitig zu bilden. In einem PCR-Reaktionsansatz befinden sich folglich mehrere Primerpaare. Die Ansprüche an die Optimierung einer solchen PCR sind hoch. Die verschiedenen Primer müssen in ihren Annealingtemperaturen möglichst übereinstimmen. Die Produkte sollten in ihrer Länge differieren, um eine Darstellung mittels der Agargelelektrophorese zu ermöglichen und sollten keine homologen Sequenzen aufweisen, um ein Fehlannealing der Primer zu verhindern.

Die Multiplex PCR ermöglicht in der mikrobiologischen Diagnostik den Nachweis verschiedener Virulenzfaktoren oder Serogruppen von Bakterien einer Spezies, aber auch die Übersicht verschiedener in einer Probe enthaltenen Bakterienarten. Ein Beispiel ist der simultane Nachweis von *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae* und *Salmonella spp.* in aus Faeces und Mucosa isolierter DNA von Schweinen (Elder et al., 1997). Viele veterinärmedizinische Veröffentlichungen konzentrieren sich allerdings

darauf, Problemkeime anhand von Toxinen oder anderer typischer Faktoren nachzuweisen und von apathogenen Typen zu differenzieren. Meer und Songer entwickelten beispielsweise 1997 ein Multiplex PCR System, das es ermöglicht, vier Haupttoxine, nach denen Clostridien in toxigene Gruppen eingeteilt werden und zusätzlich das Enterotoxin in aus Isolaten extrahierter DNA gleichzeitig darzustellen. In diesem Zusammenhang sollte auf eine Untersuchung von Kanakaraj *et al.* hingewiesen werden, in der beim simultanen Nachweis des Clostridien α -Toxins (*cpa*) und des Enterotoxins in hitzedenaturierten Isolaten in einigen Fällen falsch negative Ergebnisse auftraten (Kanakaraj *et al.*, 1998). Beim Einsatz von Faeces zeigten sich inhibitorische Effekte. Die Einsatzfähigkeit solcher Multiplex PCR Systeme ist folglich variabel und kann schwer auf veränderte Verhältnisse, wie z.B. einen anderen Probenotyp übertragen werden. Viele Faktoren, wie z.B. die Art der Probenaufbereitung spielen eine Rolle und müssen beachtet werden.

In der Vergangenheit ist die Multiplex PCR oft zum Nachweis pathogener *E. coli* erprobt und sehr erfolgreich an Bakterienisolaten durchgeführt worden. Dabei wurden sowohl die Isolate direkt, als auch die zuvor aus Bakterien extrahierte DNA in die PCR eingesetzt. 1994 entwickelten Lang *et al.* eine Multiplex PCR zum Nachweis des hitzelabilen Enterotoxins und der Shiga like Toxine I und II in Isolaten aus Küstengewässern. Dabei kam es bei zwei Primerpaaren zur Bildung unspezifischer Banden auf dem Agarosegel, die allerdings mittels der Hybridisierungstechnik geklärt werden konnten. Meng *et al.* führten 1997 an *E. coli*-Isolaten erfolgreich eine Multiplex PCR zum Nachweis des Serotyps O157:H7 mit drei Primerpaaren für Intimin (*eaeA*) und Stx 1 und 2 durch und konnten diesen humanpathogenen Stamm erfolgreich gegen andere Shigatoxinbildner abgrenzen. Franck, Bosworth und Moon konstruierten 1998 eine PCR, mit der sie in einem diagnostischen Schritt sieben Virulenzfaktoren zur Identifikation kälberpathogener *E. coli* nachwiesen. Pass, Odedra und Batt (2000) überprüften an aus Bakterienisolaten extrahierter DNA und an hitzedenaturierten Bakterien die Einsetzbarkeit und die Kombinierbarkeit elf verschiedener Primerpaare zum Nachweis der entsprechenden *E. coli* Virulenzgene und zeigten, dass es bei bestimmten Kombinationen zu Interferenzen in der Amplifikations synthese der Faktoren kommen kann. So führte der Einsatz der Primerpaare für den Cytonekrosefaktor 1 und 2 (CNF1, CNF2) zu falschen Produkten, welche die elektrophoretische Auswertbarkeit beeinträchtigten. Bei der Kombination von mehr als vier Primerpaaren gleichzeitig stellte sich tendenziell bei einigen Genen eine verminderte oder

fehlende Amplifikation ein, so dass die Autoren die nachzuweisenden elf Virulenzgene auf vier Multiplex PCRs mit maximal vier Primerpaaren verteilten.

Aber auch komplexere Proben, wie Pflanzenmaterialien und Faeces wurden ohne vorhergehende Isolation der Bakterien erfolgreich mit dieser Methode einem Screening auf *E. coli* unterzogen. So ist es möglich, den zeitaufwendigen Schritt der Isolation von Bakterien zu umgehen. Stacy-Phipps, Mecca und Weiss extrahierten 1995 DNA aus Stuhlproben mittels eines auf einer Glasmatrix beruhenden Systems und konnten das hitzestabile und das hitzelabile Enterotoxin in einem PCR Ansatz mit einer höheren Sensitivität als mit vorheriger Kultivierung darstellen. Tsen und Jian konnten 1998 in Wasserproben nach einer Voranreicherung mit einer Multiplex PCR zum Nachweis des hitzelabilen Enterotoxins I, des hitzestabilen Enterotoxins II und der Shiga like Toxine I und II noch 10^0 Zellen \cdot 100 ml^{-1} Wasser auffinden. Paton und Paton entwickelten 1999 eine Multiplex PCR, mit dem in aus Stuhlproben von Patienten mit dem Hämolytischen Urämischen Syndrom extrahierter DNA simultan Shiga Toxin bildende *E. coli* der Serogruppen O111, O157 und O113 nachgewiesen wurden. In dieser Untersuchung wurde mit Erfolg ein Touchdown System eingesetzt. Im Jahr 2000 wiesen Fratamico, Bagi und Pepe mittels einer Multiplex PCR fünf Virulenzfaktoren von *E. coli* der Serogruppe O157:H7 in aus kontaminierten Muscheln, Faeces und Alfalfa-Sprossen extrahierter DNA bis zu einer Konzentration von unter 1 CFU/g Probe nach. Die Multiplex PCR ist mit wenigen Einschränkungen in der Spezifität eine schnelle und sensitive Methode zum simultanen Nachweis einer Vielzahl verschiedener bakterieller Faktoren. Trotz des zunächst hohen Aufwandes, den die Optimierung eines MPCR Systems mit sich bringt, bedeutet die Methode in der Anwendung durch das Zusammenfassen vieler methodischer Arbeitsschritte eine deutliche Vereinfachung.

2.4.4. Hybridisierung von Nukleinsäuren mit markierten Oligonukleotidsonden

2.4.4.1. Blotting

Das Blotting ist eine Technik zum Transfer von Nukleinsäuren auf ein festes Medium, in der Regel Nylon- oder Nitrozellulosemembranen. Nylonmembranen zeigen eine höhere Reißfestigkeit, eine größere Bindungskapazität und eine bessere Fixierbarkeit der

Nukleinsäuren als Nitrozellulosemembranen. Die Bindungskapazität wird bei Nylonmembranen zusätzlich durch positive Ladungen an der Oberfläche verbessert, an denen das negativ geladene Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren bindet. Das Auftragen gereinigter DNA oder RNA wird als Dot-Blot bezeichnet. Für einen schnellen und gleichmäßigen Probenauftrag sind Blotting-Apparaturen, an denen ein Vakuum angelegt wird, von Vorteil (Mikosch, 1999).

2.4.4.2. Hybridisierung

Als Hybridisierung bezeichnet man die Reassoziaton einzelsträngiger Nukleinsäuren zu einem doppelsträngigen Molekül. Dieser Prozeß ist reversibel und unterliegt einem thermodynamischen Gleichgewicht. Die Schmelztemperatur T_m gibt an, bei welcher Temperatur die Hälfte der Moleküle als Doppelstrang vorliegt. Zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen werden diese mit einer spezifischen markierten Oligonukleotidsonde hybridisiert und die erfolgreiche Zusammenlagerung der Stränge durch Detektion der Markierung optisch nachvollzogen. Die Stabilität des Nukleinsäuredoppelstranges wird von Faktoren, wie monovalenten Kationen, dem G-C-Anteil in den Nukleinsäuresequenzen, der Länge des zu hybridisierenden Bereiches und der Anzahl fehlgepaarter Basen beeinflusst. Formamid verringert die Schmelztemperatur, indem es helixdestabilisierend wirkt (Mülhardt, 1999).

Bei der Wahl der Sonde ist zu bedenken, dass die Spezifität der Hybridisierung mit der Sondenlänge zunimmt. Sonden unter 50 Basen sind obendrein oft nur an einem Ende markiert, so dass die Signalintensität vergleichsweise gering ist. Es wird empfohlen, eine Länge von 20 Nukleotiden nicht zu unterschreiten (Breves *et al.*, 2000). Die nicht-radioaktive Markierung der Sonden erfolgt mittels Haptenen, wie Digoxigenin oder Fluorescein, Biotin oder aber photoaktiven Substanzen wie Psoralen. Die Detektion wird im Falle der Haptenmarkierung mittels eines entsprechenden Antikörpers, der mit einem Enzym, wie beispielsweise der Alkalischen Phosphatase konjugiert ist, durchgeführt. Die enzymatische Abspaltung einer Phosphatgruppe von einem zugefügten Substrat bewirkt die Emittierung von Licht oder eine Farbreaktion.

1993 zeigten Begum *et al.* den erfolgreichen Nachweis Shiga like Toxin bildender *E. coli* nach einer PCR mittels der Hybridisierung der Amplifikate mit internen Digoxigenin markierten Oligosonden. Sie erreichten 99 % der Spezifität und Sensitivität vergleichender Toxin-Neutralisationstests. Tsai, Palmer und Sangermano entwickelten 1993 eine PCR zum Nachweis des *uidA* Fragments (β -D-Glucuronidase) von *E. coli* und setzten diese in Kombination mit der Hybridisierung gegen eine Digoxigenin markierte Sonde zum Nachweis von *E. coli* in aus Schlamm und Abwasser extrahierter DNA ein. Auch zur Identifikation des zu dieser Zeit wenig bekannten Erregers der proliferativen Enteropathie in Mucosa- und Faecesproben von Schweinen wurde 1994 von McOrist, Gebhart und Lawson die Hybridisierungstechnik mit einer DIG markierten Sonde eingesetzt. Diese Methode eignet sich im Gegensatz zur histopathologischen Untersuchung zur *in vivo* Diagnostik der intrazellulären Erreger. 1997 generierten Kuhnert *et al.* zehn DIG markierte Sonden zur Detektion von RTX Toxin Genen, die für exotoxine Proteine codieren, aus ganz unterschiedlichen gram negativen Bakterien. Sie entwickelten so ein schnelles System zum Nachweis einer breiten Ebene von pathogenen Erregern. Die Hybridisierung von DNA mit internen Sonden ist ein vielfach erprobtes System zur spezifischen Detektion bakterieller Genregionen.

In dieser Arbeit dient die Hybridisierung neben der gelelektrophoretischen Auftrennung als zusätzlicher Nachweis der PCR-Produkte, insbesondere aber zur Darstellung derjenigen Pathogenitätsfaktoren, deren Produktgröße in der AGE keine deutliche Auftrennung möglich machen.

2.5 Zielstellung

Pathogene *E. coli*, insbesondere ETEC und STEC, sind allein oder als Mischinfektion einer der häufigsten Gründe für Saugferkelabgänge in der Schweineaufzucht. Hier spielt insbesondere ein wirkungsvolles Hygienemanagement und das Erkennen der Übertragungswege für das Vermeiden massiver Infektionen eine große Rolle. Die *E. coli* Pathogenitätsfaktoren lassen sich nur bedingt bestimmten Serogruppen zuordnen, so dass die Feststellung pathogener Bakterien anhand des genetischen Nachweises dieser Faktoren sicherer durchgeführt werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der PCR-Methodik eine maximale Anzahl der Pathogenitätsfaktoren schweinepathogener ETEC und STEC sowohl in Bakterienkulturen als auch in komplexen Proben spezifisch nachzuweisen und so ein System zu entwickeln, das in wenigen Arbeitsschritten einen schnellen Überblick über die Belastung des Stalles und des Tierbestandes mit diesen pathogenen *E. coli* liefert. Zusätzlich wurde ein Fütterungsversuch durchgeführt, um den Einfluß eines Probiotikums auf ETEC und STEC Pathogenitätsfaktoren zu untersuchen.