

4 Ergebnisse

4.1 Extraktion von Gesamtnukleinsäuren aus Darmmucosa von Ferkeln

Die Nukleinsäuren der in diesem Versuch eingesetzten Mucosaproben wurden nach der Extraktion einer DNA-Aufreinigung und Trennung von RNA mittels Silicagel-Säulen unterzogen.

Bei der Elution der gereinigten Nukleinsäuren durch eine hochmolare Salzlösung wurde bei Verwendung von eiskaltem Isopropanol die Bildung eines weißen Niederschlages beobachtet. Es bewährte sich also, den Durchfluß in Isopropanol mit Raumtemperatur aufzunehmen.

Der Einsatz von TE (Tris-HCl/EDTA)-Puffer, pH 8,0 zur Aufnahme des DNA Zentrifugates hat sich in diesem Versuch nicht bewährt, da dieses sich nach dem Trocknen in dem Puffer schlecht lösen ließ.

Die spektrophotometrisch ermittelte Reinheit (OD_{260}/OD_{280}) der DNA-Extrakte betrug im Mittel 1,8 (ohne Abbildung), wobei die niedrigsten Reinheitswerte in den Ileumproben und den Caecumproben festgestellt wurden.

Die DNA-Gehalte der gereinigten Nukleinsäureextrakte schwankten zwischen Werten unter $100 \mu\text{g DNA} \cdot \text{g}^{-1}$ Mucosa und bis zu $4120 \mu\text{g DNA} \cdot \text{g}^{-1}$ Mucosa. Auch die DNA-Gehalte der Einzeltiere der Futtergruppen wiesen Abweichungen auf. Der Mittelwert aller DNA-Extrakte lag bei $1204,1 \mu\text{g DNA} \cdot \text{g}^{-1}$ Mucosa.

In den Abbildungen 1 bis 4 sind die Mediane der DNA-Gehalte entlang der Darmabschnitte für die einzelnen Altersstufen dargestellt. Am 13. Lebenstag zeigten sich für die Kontrollgruppe in den distalen Dünndarmabschnitten und im Colon signifikant höhere DNA-Konzentrationen (Abbildung 1). Auch das Mittel aller Darmabschnitte zeigte signifikant höhere Werte in der Kontrollgruppe. Am 21. Lebenstag, also eine Woche nach Bereitstellung von Ergänzungsfutter mit bzw. ohne Probiotikazusatz, konnten im mittleren Jejunum für die Versuchsgruppe höhere DNA-Konzentrationen bestimmt werden (Abbildung 2). Am 28. Lebenstag intensivierten sich diese Verhältnisse dahingehend, daß

hier im Trend die DNA-Extrakte der Versuchsgruppe im Duodenum, im proximalen Jejunum und im Mittel aller Darmabschnitte höhere DNA-Gehalte aufwiesen (Abbildung 3). Vier Tage nach dem Absetzen erschien die DNA-Konzentration zwischen den Versuchsgruppen insgesamt gleichmäßiger, lediglich im Ileum und im Mittel aller Darmabschnitte zeigten sich für die Kontrollgruppe tendenziell höhere Werte (Abbildung 4).

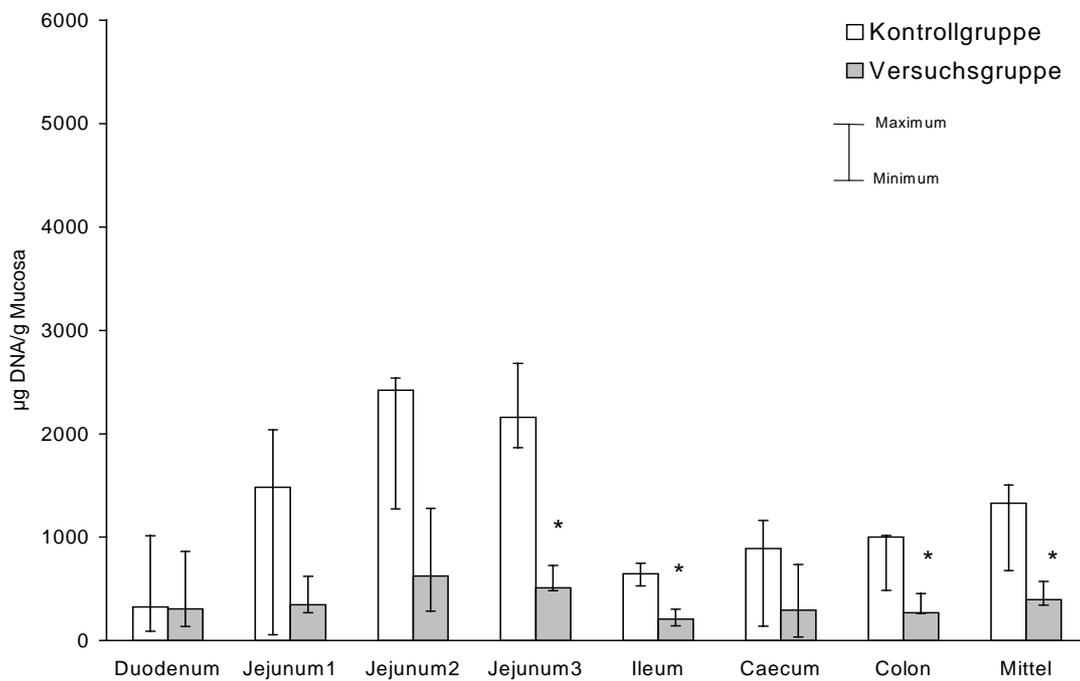


Abbildung 1: Mediane der DNA-Konzentrationen in gereinigten DNA-Extrakten aus der Mucosa von Saugferkeln (13. Lebenstag), * bezeichnet im Mann-Whitney-Test ermittelte Signifikanzen

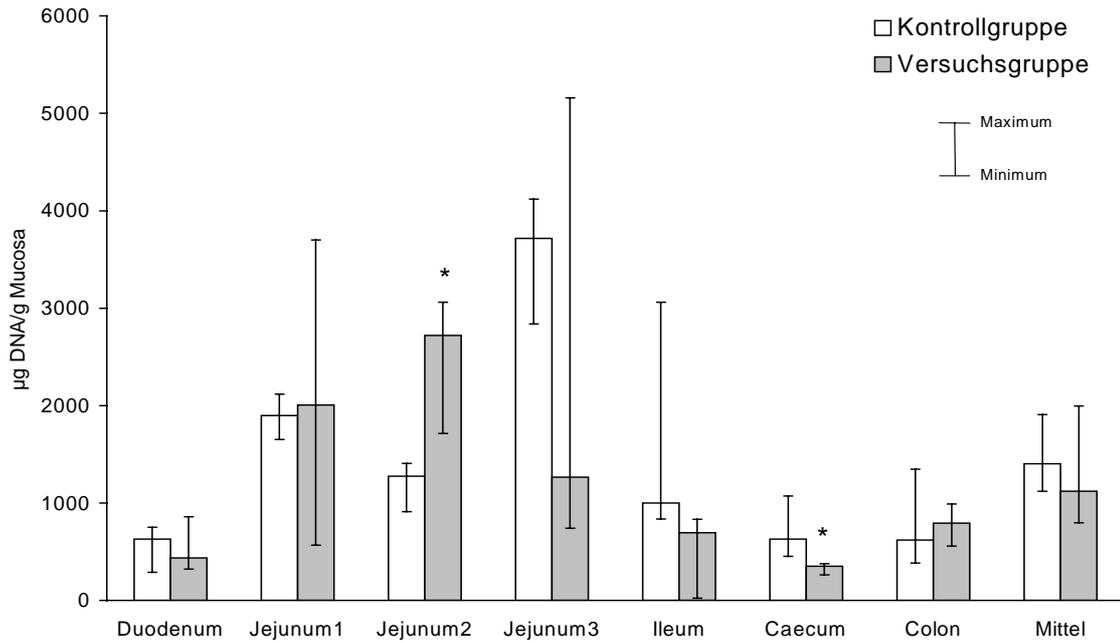


Abbildung 2: Mediane der DNA-Konzentrationen in gereinigten DNA-Extrakten aus der Mucosa von Saugferkeln (21. Lebenstag), * bezeichnet im Mann-Whitney-Test ermittelte Signifikanzen

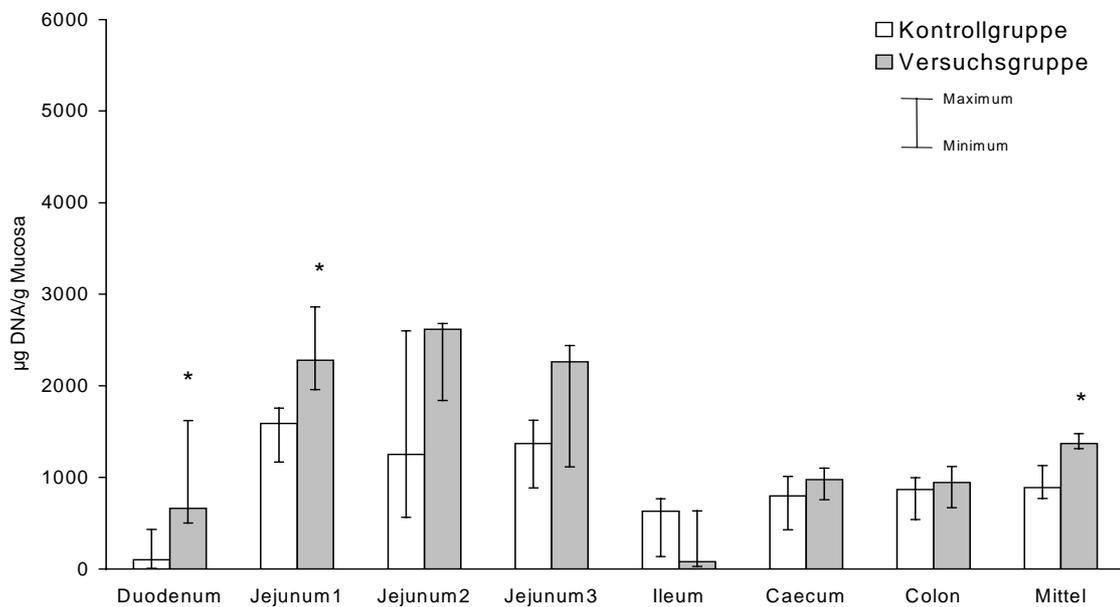


Abbildung 3: Mediane der DNA-Konzentrationen in gereinigten DNA-Extrakten aus der Mucosa von Absetzferkeln (28. Lebenstag), * bezeichnet im Mann-Whitney-Test ermittelte Signifikanzen

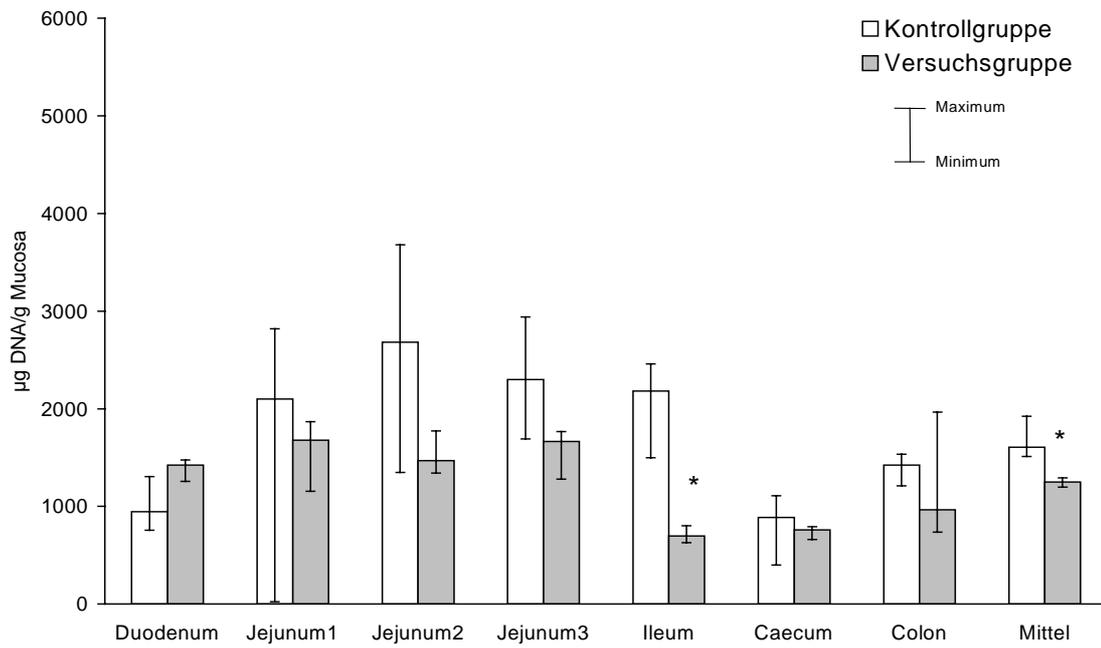


Abbildung 4: Mediane der DNA-Konzentrationen in gereinigten DNA-Extrakten aus der Mucosa von Absetzferkeln (32. Lebenstag), * bezeichnet im Mann-Whitney-Test ermittelte Signifikanzen

4.2 PCR Untersuchungen

4.2.1 Optimierung der PCR-Bedingungen zum Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren

4.2.1.1 Multiplex PCR

Auf eine Optimierung der Primerkonzentrationen zueinander wurde verzichtet. Im Folgenden ist unter dem Begriff ‚Primer‘ immer die äquimolare Mischung der einzelnen Primer zu verstehen. Um die optimalen Primerkonzentrationen zu bestimmen, wurden als Positivkontrolle der Stamm O138:K81, als Negativkontrolle der Stamm O127:H6, die DNA von zwei *E. coli* Isolaten aus der Fallstudie in einer Konzentration von 1 ng DNA/ μ l und ein mucosaler DNA-Extrakt in einer Konzentration von 100 ng DNA/ μ l unter Einsatz von 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 μ M Primer mittels der Standard-PCR untersucht. PCR-Produkt wurde auf Agarosegelen erstmalig in dem 0,6 μ M-Primermix erkennbar. Die Primerkonzentration von 0,6 μ M stellte sich somit als optimal heraus (ohne Abbildung).

Diese Optimierung erfolgte auf dem T Personal Cycler (Fa. Biometra) und wurde für einen T1-Thermocycler (Fa. Biometra) wiederholt. Da bereits Anhaltspunkte über den optimalen Konzentrationsbereich der Primer vorlagen, wurde für den T1-Thermocycler der experimentellen Rahmen in 0,1 μ M-Schritten von 0,4 μ M bis 0,6 μ M gewählt.

Der 0,5 μ M Primermix lieferte bei Verwendung des T1-Thermocyclers die größte Menge PCR-Produkt, ohne unspezifische Banden zu zeigen, während die 0,4 μ M Primerlösung einige unspezifische Banden aufwies und insgesamt nur geringe Bandenintensitäten zeigte. Die 0,6 μ M Primerkonzentration wies allerdings die geringste Produktmenge auf. Einige Banden, die in der 0,5 μ M-Konzentration sichtbar waren, so die Produkte von *est-Ib*, *elt-Ia* und *stx2e*, erschienen hier nicht mehr (ohne Abbildung). Somit erwies sich eine Primerkonzentration von 0,5 μ M als optimal, um alle Pathogenitätsfaktoren darzustellen.

Zur Bestimmung der Sensitivitätsgrenze wurde die DNA verschiedener *E. coli*-Stämme in Konzentrationen von 1 ng bis 100 fg DNA je Versuchsansatz einer Touchup-PCR

unterzogen. Die auf den Agarosegelen resultierenden Banden zum Nachweis der einzelnen Pathogenitätsfaktoren wiesen unterschiedliche Intensitäten auf. Als Beispiel ist in Abbildung 5 ein Agarosegel mit den *E. coli* Stämmen O147:K89:K88 und O101:H- dargestellt. So zeigte sich das Amplifikat für *fedA* im Vergleich zu dem für *stx2e* sehr deutlich. Alle Pathogenitätsfaktoren ließen sich bis zu einer Ausgangskonzentration von 1 pg in die PCR eingesetzter Referenz-DNA darstellen.

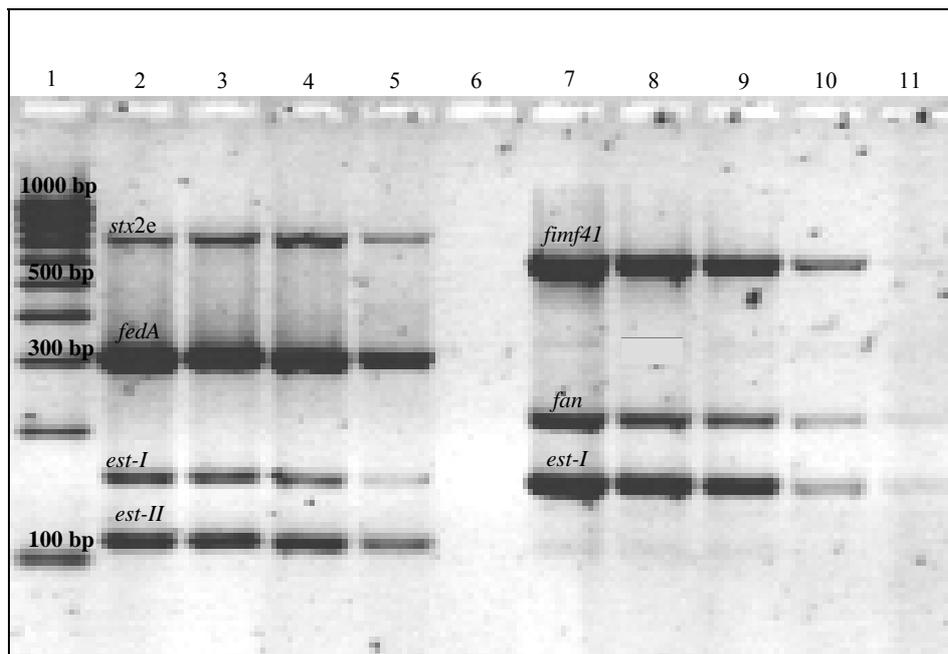


Abbildung. 5: Agarosegel zur Darstellung der Sensitivität beim Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren mit der Multiplex PCR;

Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2-5: *E. coli* O138:K81; Spur 6: Mastermix leer; Spur 7-11: *E. coli* O101:H-, Spur 2 und 7: 1 ng DNA; Spur 3 und 8: 100 pg DNA; Spur 4 und 9: 10 pg DNA; Spur 5 und 10: 1 pg DNA; Spur 11: 0,1 pg DNA

Zur Bestimmung der Spezifität und der Sensitivität der Multiplex PCR bei Anwesenheit eines hohen Gehaltes an unspezifischer DNA wurden 1:1 Gemische aus DNA pathogener *E. coli* und 100 ng DNA apathogener *E. coli* zu einer Endkonzentration von 10 ng, 1 ng, 100 pg und 10 pg in eine Touchup-PCR eingesetzt (Abbildung 6). Die Amplifikate für *fimf41* und *elt-Ia* waren in den 10 pg Konzentrationen deutlich nachzuweisen. Die PCR Produkte von *stx2e* und *est-Ib* zeigten bei 100 pg noch starke Banden, die von *est-II* waren

bei 100 pg *E. coli*-DNA nur noch schwer erkennbar. Banden zum Nachweis von *fae* und *fedA* zeigten sich bis zu einer Konzentration von 1 ng eingesetzter *E. coli*-DNA. Die höchste Produktmenge fand sich bei den 100 pg-Lösungen. Das Auftreten unspezifischer Banden variierte je nach gewählter Konzentration der *E. coli*-DNA und begann in sehr schwacher Form bereits bei einer Konzentration von 10 ng. Der Stamm O101:H- zeigte in Kombination mit der DNA apathogener *E. coli* die Bande für *fan* nicht.

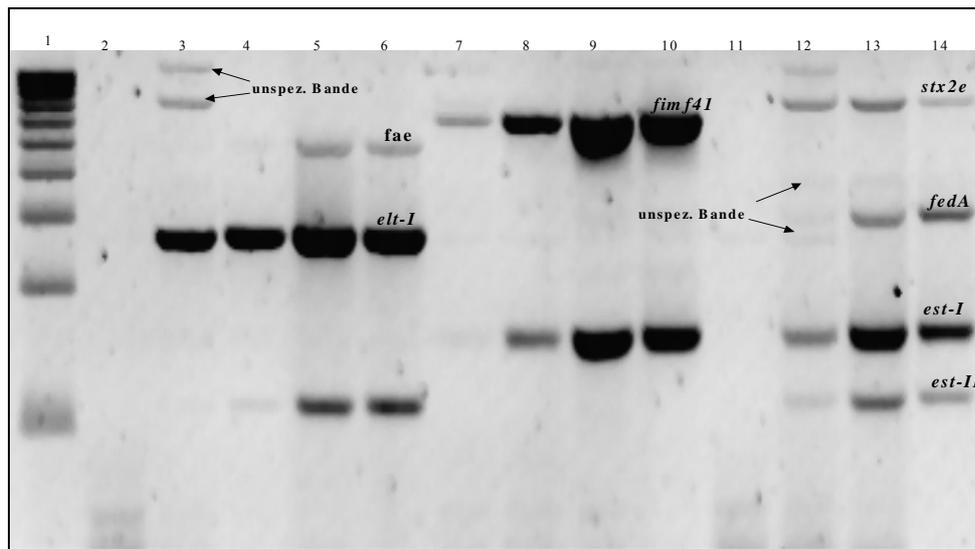


Abbildung 6: Sensitivität und Spezifität bei Kombination von DNA aus schweinepathogenen *E. coli*-Stämmen und einem schweineapathogenen Stamm in der Multiplex PCR;

Spur 1: Molekulargewichtstandard;

Spur 2: Mastermix leer;

Spur 3-6: *E. coli* O147:K89:K88;

Spur 7-10: *E. coli* O101:H-;

Spur 11-14: *E. coli* O138:K81;

Spur 3, 7 und 11: 10 pg DNA aus schweinepathogenen Stämmen in 100 ng DNA O127:H6 ;

Spur 4, 8 und 12: 100 pg DNA aus schweinepathogenen Stämmen in 100 ng DNA O127:H6;

Spur 5, 9 und 13: 1 ng DNA aus schweinepathogenen Stämmen in 100 ng DNA O127:H6;

Spur 6, 10 und 14: 10 ng DNA aus schweinepathogenen Stämmen in 100 ng DNA O127:H6

Zur Steigerung der Sensitivität und der Spezifität der Multiplex PCR wurden verschiedene Thermocycler-Programme getestet (Abbildung 7). Die Standard-PCR ergab nur eine ungenügende Wiedergabe der erwarteten Banden (Abbildung 7A). Erst bei Einsatz in der Touchup-PCR zeigten sich alle Pathogenitätsfaktoren in dem erwarteten Ausmaß (Abbildung 7B). Die Bandenqualität erschien zwar im Vergleich zu der Touchdown PCR geringer, dafür wurden keine unspezifischen Amplifikate nachgewiesen. Die Touchdown PCR lieferte die höchste Menge an Produkt, neigte dadurch aber zu einer unsaubereren Auftrennung der Banden und wies obendrein eine Vielzahl unspezifischer Banden auf (Abbildung 7C). In der Negativkontrolle konnten ebenfalls unspezifische PCR-Produkte nachgewiesen werden.

Die Anzahl der Zyklen wirkte sich je nach Probenart unterschiedlich auf die Qualität der Amplifikate aus. Bei den mucosalen DNA-Extrakten förderte die Erhöhung der Zyklusanzahl die Menge an PCR Produkt. Insbesondere zum Einsatz in die Hybridisierung bewährte sich eine Touchup PCR mit 35 Zyklen. Bei *E. coli* Stämmen führte eine Zyklusanzahl von über 30 zur Bildung unspezifischer Amplifikate und zu einer Bildung ungleich intensiver Banden. Die gelelektrophoretische Auswertung erwies sich dadurch als besonders schwierig, als daß die Größe des gebildeten PCR Produktes bei einigen sehr intensiven Banden nicht bestimmt werden konnte. Auch überdeckten sich andere Banden mit ähnlichen Molekulargewichten, wie beispielsweise die Produkte von *elt-Ia* und *fedA*. Bei einer Verdünnung der PCR-Produkte wurde die Sensitivität verringert, so daß weniger intensive Banden, wie beispielsweise das Produkt von *fan*, nicht mehr darstellbar waren (ohne Abbildung).

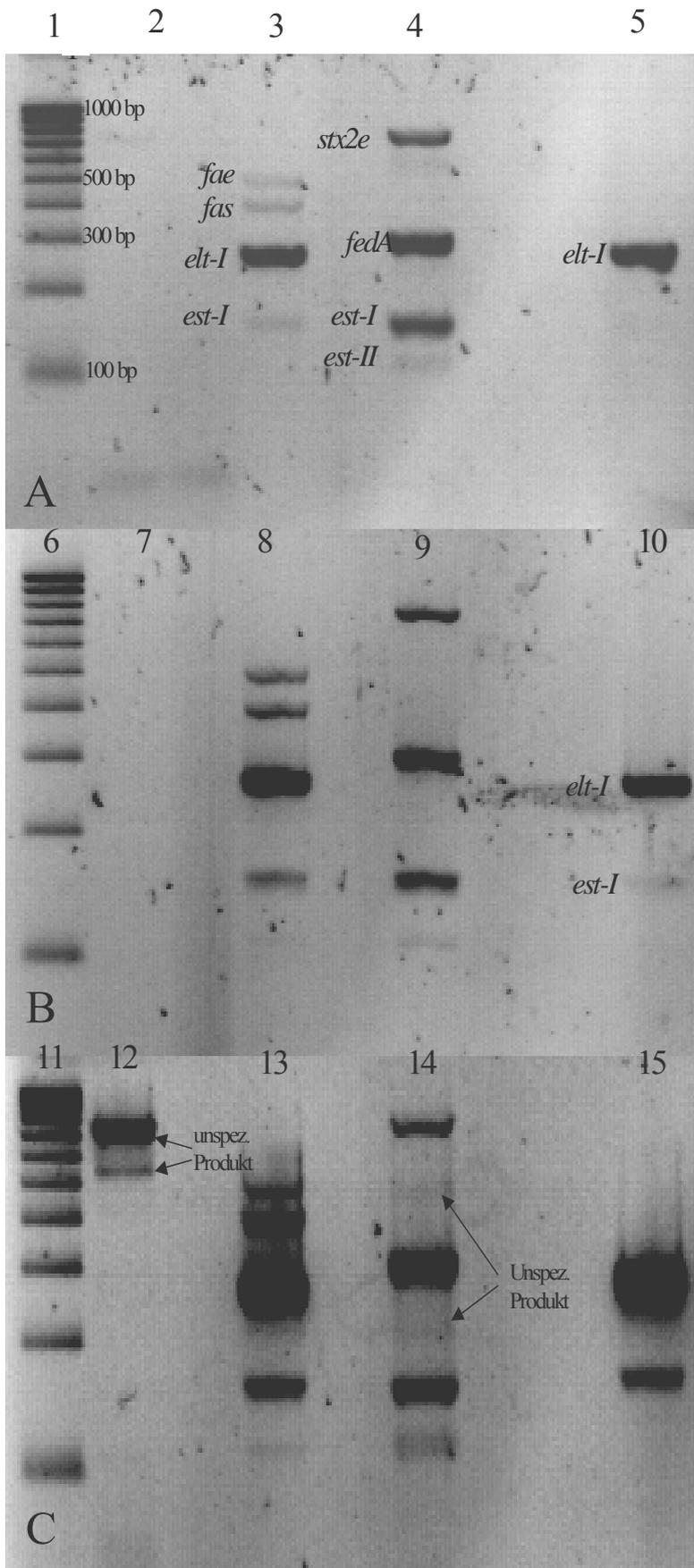


Abbildung 7: Vergleich verschiedener Agarosegele nach Verwendung unterschiedlicher Thermocycler Programme zum Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren mit der Multiplex PCR

Spur 1, 6, 11: Molekulargewichtstandard

Spur 2, 7, 12: *E. coli*-Negativkontrolle

Spur 3, 8, 13: O149:K91

Spur 4, 9, 14: O138:K81

Spur 5, 5, 10, 15: O78:K80:H11

A: Standard-PCR :

15 min 95 °C; 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 53 °C/ 54 °C/ 55 °C , 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C

B: Touchup PCR

15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 50 °C (+0,4 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C

C: Touchdown PCR

15 min 95 °C; 10 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 60 °C (-0,6 °C/Zyklus), 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 30 Zyklen: 30 sec 94°C, 30 sec 54 °C, 60 sec 72 °C (+ 3 sec/Zyklus); 10 min 72 °C

4.2.1.2 PCR zum Nachweis von *fae*

Da mittels der Multiplex PCR im Falle der mucosalen DNA Extrakte der Nachweis von *fae* in keiner Probe möglich war, wurde dieser Faktor zusätzlich in einer getrennten PCR nachgewiesen.

In die PCR zum Nachweis von *fae* wurden zunächst Konzentrationen mucosaler DNA von 50 ng und 100 ng eingesetzt. Während bei 50 ng mucosaler DNA pro PCR-Ansatz kein *fae* detektiert werden konnte, zeigten sich bei 100 ng DNA deutlich auswertbare Banden (ohne Abbildung).

Zur Optimierung der Primerkonzentration wurde DNA aus *E. coli* Stämmen und mucosale DNA-Extrakte einer Standard-PCR (35 Zyklen/ 54 °C Annealing) unterzogen. Die Primerkonzentrationen von 0,3 µM und 0,4 µM waren durch wenig gebildetes Amplifikat geprägt. Hier kam es außerdem zur Bildung mehrerer unspezifischer Banden, die sich bei einer Konzentration von 0,5 µM Primer verringerten, während die Menge an spezifischem PCR-Produkt deutlich zunahm. Bei einer Primerkonzentration von 0,6 µM zeigte sich eine Zunahme des PCR-Produktes, aber auch eine vermehrte Schlierenbildung der Banden auf Agarosegelen und eine Vielzahl schwacher, unspezifischer Banden (ohne Abbildung).

Die Optimierung der Annealingtemperatur wurde mittels DNA aus *E. coli* Stämmen und mucosalen DNA Extrakten anhand einer Standard-PCR mit 35 Zyklen von 48 °C in 2 °C-Schritten bis 54 °C durchgeführt. Die Bande zum Nachweis von *fae* war in allen Ansätzen gleichermaßen deutlich. Die Anzahl der unspezifischen Amplifikate unterschieden sich dahingehend, daß bei den Temperaturen von 48 °C bis 52 °C je zwei sehr starke unspezifische Banden zu sehen waren. Bei 54 °C zeigte sich eine unspezifische Bande.

Beim Vergleich unterschiedlicher PCR-Programme fiel wiederum die Standard-PCR durch eine geringe Produktbildung und die Touchdown-PCR durch das Auftreten unspezifischer Banden und in einem Fall durch ein falsch negatives Ergebnis auf.

Für die Untersuchung wurde das Touchup Programm (10 Zyklen 50 °C (+0,4 °C/Zyklus) und 35 Zyklen 54 °C) als optimales Thermocyclerprogramm gewählt.

4.3 Optimierung der Hybridisierung interner Oligonukleotidsonden mit PCR-Produkten

DNA aus fünf *E. coli* Stämmen wurden mit einer Touchup Multiplex PCR amplifiziert. Zum Einsatz kamen in \log_{10} -Schritten Konzentrationen von 10 ng bis 1 fg DNA aus *E. coli* Stämmen, 100 ng mucosalen DNA-Extrakten und Kombinationen aus 100 ng mucosalen DNA-Extrakten und DNA aus *E. coli* Stämmen in Konzentrationen von 1 ng bis 1 fg.

Beim Vergleich eines formamidfreien SSC-SDS-Hybridisierungspuffers und einem kommerziellen System (DigEasyHyb, Roche, Mannheim, Deutschland) erwies sich der formamidfreie SSC-SDS-Puffer als der besser Geeignete. Abbildung 8 zeigt, dass der kommerzielle Puffer bei 100 fg DNA aus *fae*-positiven *E. coli* ein schwächeres Signal lieferte, während *fae* mit dem SSC-SDS-Puffer deutlicher nachweisbar war. Noch größer war der Verlust der Signalintensität bei Kombination aus 100 ng mucosalem DNA-Extrakt und 100 fg DNA aus *E. coli*. Die mit dem kommerziellen Puffer inkubierten Sonden für *fimf41a* und *fae* erreichten maximal ein Pikogramm mit 100 ng Mucosa-DNA kombinierte *E. coli*-DNA.

Acht der neun Sonden waren bei den in Tabelle 10 dargestellten Hybridisierungstemperaturen spezifisch. Die Sonde zur Detektion von *fae* zeigte bei Einsatz der mucosalen DNA-Extrakte nach der Multiplex PCR keine Ergebnisse. Die Hybridisierung von DNA aus *E. coli* Stämmen nach der Multiplex PCR verlief allerdings erfolgreich.

In SSC-SDS-Puffer wiesen sechs von neun Sonden zum Nachweis von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren eine Sensitivitätsgrenze von 1 fg in die PCR eingesetzter DNA aus *E. coli* Reinkulturen auf. Drei Sonden zeigten positive Signale bei 10 fg in die PCR eingesetzter DNA aus *E. coli* Reinkulturen (siehe Tabelle 10).

Bei den PCR Ansätzen mit je 100 ng mucosalen DNA-Extrakten und steigenden Mengen DNA aus *E. coli* Reinkulturen lagen die Sensitivitätsgrenzen für drei Sonden zum Nachweis von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren bei 100 fg, für fünf Sonden bei 10 fg und für *fimf41a* bei 1 fg in die PCR eingesetzter *E. coli*-DNA (siehe Tabelle 10).

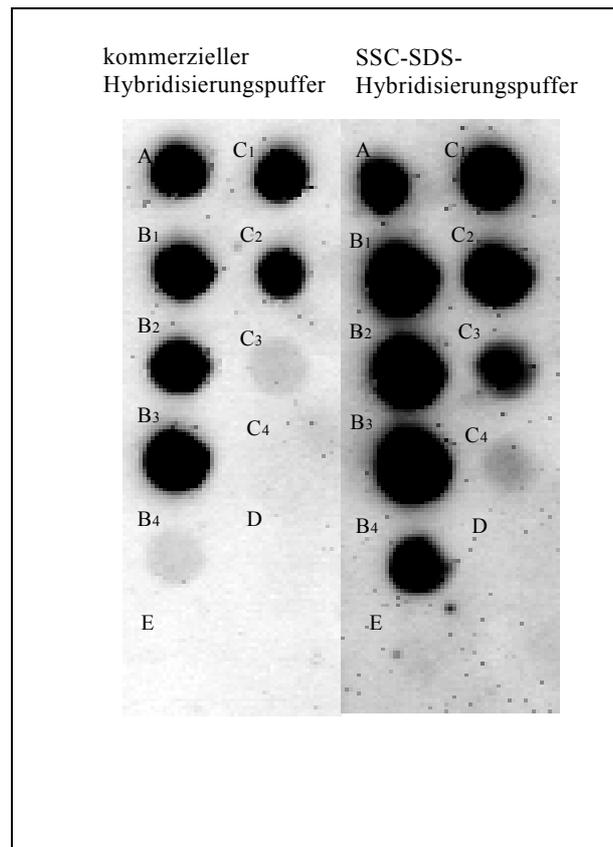


Abbildung 8: Sensitivitätsvergleich verschiedener Hybridisierungspuffer beim Nachweis von *fae* in PCR-Produkten von DNA aus *E. coli* O147:K89:K88, bzw. deren Kombination mit mucosalen DNA-Extrakten
A 30 pM DIG-Standard; **B1** 100 pg O147:K89:K88; **B2** 10 pg O147:K89:K88; **B3** 1 pg O147:K89:K88; **B4** 100 fg O147:K89:K88; **C1** O147:K89:K88, 100 pg mit 100 ng mucosaler DNA; **C2** O147:K89:K88, 10 pg mit 100 ng mucosaler DNA; **C3** O147:K89:K88, 1 pg mit 100 ng mucosaler DNA; **C4** O147:K89:K88, 100 fg mit 100 ng mucosaler DNA; **D** PCR-Mastermix mit H₂O; **E** 100 pg O101:H- (Negativkontrolle)

Tabelle 10: Sensitivitätsgrenzen für den Nachweis von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren mittels PCR und nachfolgender Hybridisierung der PCR Produkte gegen Oligonukleotidsonden

	<i>est-Ib</i>	<i>est-II</i>	<i>fan</i>	<i>elt-Ia</i>	<i>fedA</i>	<i>fas</i>	<i>fae</i>	<i>fimf41a</i>	<i>stx2e</i>
Hybridisierungstemperatur (T _{HYB})	35 °C	40 °C	35 °C	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C	35 °C	40 °C
DNA aus <i>E. coli</i> Reinkulturen	1 fg	1 fg	1 fg	1 fg	1 fg	10 fg	10 fg	1 fg	10 fg
<i>E. coli</i> DNA in 100 ng mucosalem DNA-Extrakt	10 fg	100 fg	10 fg	100 fg	10 fg	100 fg	10 fg	1 fg	10 fg

4.4 Anwendung der Multiplex PCR

4.4.1 Fallstudie zum Vorkommen pathogener *E. coli* beim Ferkel

Zur Überprüfung der PCR-Methodik wurden als Fallstudie zum Vorkommen pathogener *E. coli* Bakterien beim Ferkel die Kulturüberstände von 93 *E. coli*-Kolonien, die aus Mucosaproben eines 35 Tage alten Hybridferkels gewonnen wurden, der Multiplex PCR unterzogen. Durch Untersuchung dieser Isolate konnte die Verteilung pathogener *E. coli* im Verlauf des Darmtrakts eines an Durchfall erkrankten Absetzferkels dargestellt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anzahl adhäsiver *E. coli* Isolate mit Pathogenitätsfaktoren aus dem Darmtrakt eines an Durchfall erkrankten Absetzferkels

	Duodenum	Jejunum1	Jejunum2	Jejunum3	Ileum	Caecum	Colon	Gesamt
<i>est-II</i>	2	1	1	-	3	12	1	20
<i>est-Ib</i>	8	-	-	-	-	7	-	15
<i>fan</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>elt-Ia</i>	11	-	-	2	3	-	2	18
<i>fedA</i>	14	9	-	-	12	9	4	48
<i>fas</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>fae</i>	4	-	-	-	1	-	3	8
<i>stx2e</i>	9	3	-	1	10	1	6	30
Negative Isolate	1	3	9	12	-	-	2	27
Untersuchte Isolate/ Darmabschnitt	15	13	10	14	17	13	11	93
Virulenzfaktoren/ untersuchte Isolate	3,3	0,77	0,1	0,17	1,71	2,23	1,45	

Von 93 untersuchten Isolaten zeigten 66 ein positives Ergebnis in der PCR.

Die größte Belastung mit *E. coli* Pathogenitätsfaktoren wiesen bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Isolate aus diesen Darmabschnitten das Duodenum und das Caecum auf. Die drei jejunalen Abschnitte zeigten die geringste Frequenz an Virulenzfaktoren. Der am häufigsten nachzuweisende Faktor war *fedA*. Er trat insbesondere im Duodenum und im Ileum in einer großen Zahl der untersuchten Isolate auf. Acht Isolate zeigten in der PCR ein positives Ergebnis für *fae*, und nur je ein Isolat für *fan* bzw. *fas*.

Von den Toxingenen konnte *stx2e*, insbesondere im Duodenum und im Ileum bevorzugt nachgewiesen werden. Von den Genen der hitzestabilen Enterotoxine zeigte sich *est-II* schwerpunktmäßig im Caecum, während *est-Ib* sowohl im Duodenum als auch im Caecum gleichermaßen oft nachgewiesen wurde. Das Duodenum wies eine größere Zahl *elt-Ia*- positive Isolate auf.

Tabelle 12: Kombination von Pathogenitätsfaktoren in *E. coli* Isolaten aus dem Darmtrakt eines an Durchfall erkrankten Absetzferkels

Pathogenitätsfaktor	Isolate (n=93)
<i>est-Ib/ fedA</i>	1
<i>est-Ib/ est-II/ fedA</i>	7
<i>est-Ib/ fedA/ stx2e</i>	1
<i>est-Ib/ elt-Ia/ fedA</i>	2
<i>est-Ib/ est-II/ elt-Ia/ fedA</i>	1
<i>est-Ib/ est-II/ fedA/ stx2e</i>	1
<i>est-Ib/ elt-Ia/ fedA/ stx2e</i>	2
<i>est-II</i>	9
<i>est-II/ elt-Ia</i>	1
<i>est-II/ fedA</i>	1
<i>elt-Ia</i>	2
<i>elt-Ia/ stx2e</i>	1
<i>elt-Ia/ fae/ stx2e</i>	3
<i>elt-Ia/ fedA/ stx2e</i>	1
<i>elt-Ia/ fedA/ fae/ stx2e</i>	4
<i>elt-Ia/ fedA/ fan/ fas/ stx2e</i>	1
<i>stx2e</i>	1
<i>stx2e/ fae</i>	1
<i>stx2e/ fedA</i>	14
<i>fedA</i>	12
PCR negative Isolate	27

Tabelle 12 zeigt die Kombinationen und die Häufigkeit der nachgewiesenen Pathogenitätsfaktoren in den untersuchten Isolaten.

Der am häufigsten nachgewiesene unkombinierte Faktor war *fedA* (12 Isolate). Weitere 14 Isolate zeigten *fedA* in Kombination mit *stx2e*. In 7 Isolaten konnte dieses Fimbriumgen gemeinsam mit den Genen der beiden hitzestabilen Enterotoxine nachgewiesen werden.

Ebenfalls in einer vergleichsweise großen Anzahl von Isolaten (9 Isolate) konnte *est-II* als alleiniger Pathogenitätsfaktor nachgewiesen werden.

Nur ein geringer Anteil der *E. coli* Isolate zeigte mehr als drei kombinierte Virulenzfaktorgene.

4.4.2 Untersuchung der Verteilung pathogener *E. coli* in Stallanlagen des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin

Insgesamt wurden 331 Isolate aus Kotproben von Sauen und Ferkeln der Multiplex PCR unterzogen. Die Hybridisierung erfolgte gegen sechs interne Oligonukleotidsonden für die folgenden *E. coli* Pathogenitätsfaktorgene: *est-Ib* (StaP), *est-II* (Stb), *elt-Ia* (LT I), *fedA* (F18), *fae* (F4) und *stx2e* (Stx2e). Auf den Nachweis von F5 und F6 wurde verzichtet, da es sich bei den untersuchten Tieren bereits um Absetzferkel handelte. Auch das Vorkommen von F41 wurde nicht mehr untersucht, da sowohl bei Versuch 1 als auch Versuch 3 keine Probe *fimf41a* positiv reagierte.

In Abbildung 9 sind beispielhaft die Chemilumineszenzsignale für den Nachweis von *est-II* dargestellt. Die Signale waren für diese Sonde deutlich und im Wesentlichen bei allen Isolaten von homogener Intensität.

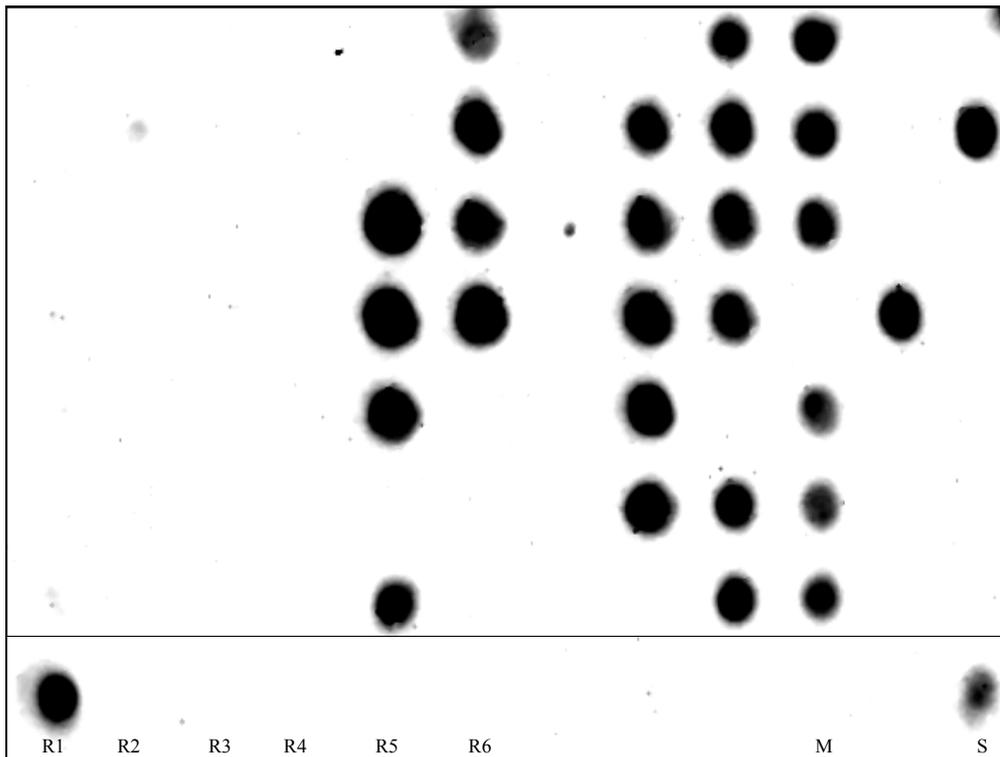


Abbildung 9: Nachweis von *est-II* in Isolaten aus Ferkelkotproben, entnommen aus dem Aufzuchtstall des Institut für Tierernährung

R1, PCR-Produkt der *est-II* positiven *E. coli* Reinkultur Nr.1 aus der Fallstudie; **R2**, O9:K35:K99; **R3**, PCR-Produkt der *est-II* negativen *E. coli* Reinkultur Nr. 5.2 aus der Fallstudie; **R4**, O78:K80:H11; **R5**, PCR-Produkt der *est-II* negativen *E. coli* Reinkultur Nr. 3.4 aus der Fallstudie; **R6**, O149:K91; **M**, Mastermix leer; **S**, DIG-Standard

In Abbildung 10 sind beispielhaft die Chemilumineszenzsignale für *elt-Ia* abgebildet. Im Vergleich zum Nachweis von *est-II* wiesen die Proben beim Nachweis von *elt-Ia* unterschiedliche Signalintensitäten auf. Der Mastermix reagierte jedoch bei der Hybridisierung negativ, so dass nicht von einer Kontamination ausgegangen werden konnte. Das Mischen aller eingesetzten Referenzstämme führte in drei Verdünnungen zu einheitlichen Signalintensitäten. Eine Hemmung des PCR Nachweises durch hohe unspezifische DNA Mengen wurde nicht beobachtet.

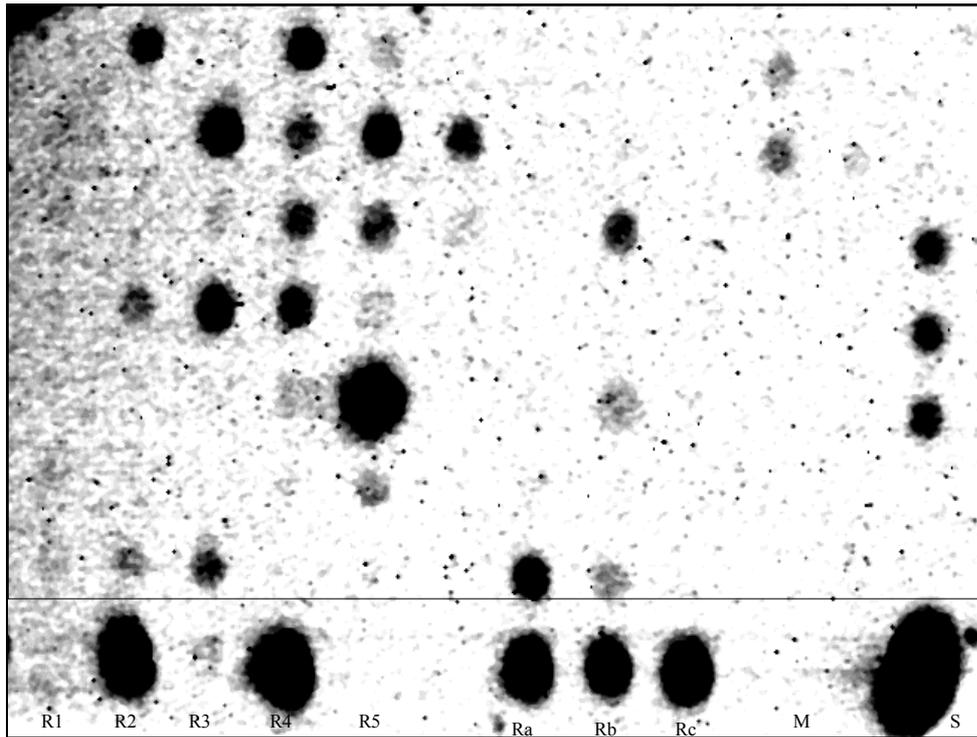


Abbildung 10: Nachweis von *elt-Ia* in Isolaten aus Ferkelkotproben, entnommen aus dem Aufzuchtstall des Institut für Tierernährung

R1, PCR-Produkt der *elt-Ia* negativen *E. coli* Reinkultur Nr.1 aus der Fallstudie; **R2**, PCR-Produkt der *elt-Ia* positiven *E. coli* Reinkultur Nr. 5.2 aus der Fallstudie; **R3**, O9:K35:K99; **R4**, O78:K80:H11; **R5**, PCR-Produkt der *elt-Ia* negativen *E. coli* Reinkultur Nr. 3.4 aus der Fallstudie; **Ra**, Gemisch aus R1 bis R5, unverdünnt als Ziel-DNA in die PCR eingesetzt; **Rb**, Gemisch aus R1 bis R5, 1:10 als Ziel-DNA in die PCR eingesetzt, **Rc**, Gemisch aus R1 bis R5, 1:100 als Ziel-DNA in die PCR eingesetzt; **M**, Mastermix leer; **S**, DIG-Standard

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse von der Untersuchung der Verteilung pathogener *E. coli* in ausgewählten Versuchsanlagen des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Vorkommen und Kombinationen von Pathogenitätsfaktoren in *E. coli* Isolaten aus Ferkel-, bzw. Sauenboxen

Ferkel: n = 48, Gruppen von bis zu zwei Tieren in Flatdecks, 14 Tage nach dem Absetzen

Sauen: n = 32, Gruppen von drei bis fünf Tieren in Laufboxen

<i>Pathogenitätsfaktor</i>	<i>Isolate aus Ferkelkotproben (n=210)</i>	<i>Isolate aus Sauenkotproben (n=121)</i>
<i>est-Ib</i>	8	16
<i>est-Ib/ est-II</i>	5	10
<i>est-Ib/ elt-Ia</i>	2	6
<i>est-Ib/ fedA</i>	8	0
<i>est-Ib/ est-II/ fedA</i>	5	0
<i>est-Ib/ est-II/ fae</i>	6	1
<i>est-Ib/ est-II/ elt-Ia</i>	7	7
<i>est-Ib/ elt-Ia/ fae</i>	3	0
<i>est-Ib/ elt-Ia/ stx2e</i>	0	1
<i>est-Ib/ est-II/ elt-Ia/ fedA</i>	1	0
<i>est-Ib/ est-II/ elt-Ia/ fae</i>	6	1
<i>est-Ib/ est-II/ elt-Ia/ stx2e</i>	0	1
<i>est-II</i>	10	19
<i>est-II/ elt-Ia</i>	4	2
<i>est-II/ stx2e</i>	0	1
<i>est-II/ fedA</i>	3	0
<i>est-II/ fae</i>	26	0
<i>est-II/ elt-Ia/ stx2e</i>	2	0
<i>est-II/ stx2e/ fedA</i>	2	0
<i>elt-Ia</i>	6	7
<i>elt-Ia/ fedA</i>	9	0
<i>stx2e</i>	2	0
<i>stx2e/ fedA</i>	1	0
<i>fedA</i>	34	0
<i>fae</i>	0	0
PCR negative Isolate	60	49

Von 210 Isolaten aus Ferkeln zeigten 150 Isolate ein positives Ergebnis in der PCR (71,4%). Ein hoher Prozentsatz wies nur *fedA* als Pathogenitätsfaktor auf (16,2 %). Weitere unkombinierte Faktoren waren das Gen für das hitzestabile Enterotoxin I (*est-Ib* - 3,8 %) und für das hitzestabile Enterotoxin II (*est-II* - 4,8 %). Die anderen Toxingene wurden nur in wenigen Isolaten nachgewiesen, so das des hitzelablen Enterotoxins (*elt-Ia*) in 2,9 % und das des Shiga like Toxin2e (*stx2e*) in 0,95 % der Fälle. 23,8 % der Isolate

zeigten das Vorhandensein einer oder mehrerer Toxingene ohne daß Gene für Adhäsionsfaktoren nachgewiesen werden konnten.

In dieser Studie zeigten 19,5 % der Isolate ein *fae* positives Ergebnis. Die häufigste genetische Kombination bei den Absetzferkeln war *fae/ est-II* (12,4%). In je 2,9 % der Isolate zeigte sich *fae* in Kombination mit den Genen der beiden hitzestabilen Enterotoxine, bzw. mit allen drei Enterotoxingenen gemeinsam.

FedA wiesen 30,5 % der Isolate als Adhäsionsfaktor auf. Das Fimbriumgen konnte in den Kombinationen *fedA/ elt-Ia* (4,3 %), *fedA/ est-Ib* (3,8 %), *fedA/ est-II* (1,4 %) und *fedA/ stx2e* (0,5 %) nachgewiesen werden. In 2,4 % der Isolate tauchte *fedA* in Kombination mit den Genen der beiden hitzestabilen Enterotoxine auf.

In 26,2 % der Isolate konnte *est-Ib* nachgewiesen werden. Am häufigsten fand es sich unkombiniert (5,7 %) oder in Kombination mit *fedA* (3,8 %), bzw. mit *est-II* und *elt-Ia* gemeinsam (3,3 %). In 12,4 % der Isolate trat *est-Ib* ohne Kombination mit einer der hier untersuchten Fimbriengene auf.

Ein großer Teil der Isolate wies die Sequenz von *est-II* auf (37,1 %). Dabei waren 4,8 % mit dem Toxingen allein versehen, 18,1 % mit der Sequenz von *fae* und 5,7 % mit *fedA* kombiniert. In 13,3 % der Isolate wurde *est-II* ohne Vorhandensein eines der untersuchten Adhäsionsfaktorgene nachgewiesen. Die prägnanteste Kombination beim Ferkel war *est-II* mit *fae* (12,4 %).

In 19,1 % der Isolate wurde *elt-Ia* nachgewiesen. Nur 2,9 % trugen das Toxingen allein, 4,3% waren mit *fae* assoziiert, 4,8 % mit *fedA*. 10 % der Isolate zeigten *elt-Ia* ohne Vorhandensein eines der hier untersuchten Adhäsionsfaktorgene. Der größte Teil zeigte sich in Kombination mit den Sequenzen der beiden hitzestabilen Enterotoxine (3,3 %).

Nur 2,4 % der Isolate zeigten Gen für das Shiga like Toxin2e. 1,4 % waren in Kombination mit *fedA* zu finden. Keines der *stx2e* positiven Isolate zeigte das Vorhandensein von *fae*. Zwei Isolate trugen neben *stx2e* und *fedA* auch die Sequenz von *est-II*. In diesem Versuch wiesen 1,9 % das Toxingen ohne Verbindung zu einem hier untersuchten Fimbriumgen auf.

Von den 121 untersuchten Isolaten aus den Sauenfaeces waren 72 Isolate (59,5 %) mit Virulenzfaktorgen ausgestattet. Der größte Teil (53,7 %) zeigte die Sequenzen für ein oder beide hitzestabile Enterotoxine allein oder in Kombination mit anderen Faktorgenen.

In 35,5 % der Isolate wurde in der PCR *est-Ib* nachgewiesen, wobei 13,2 % ohne weitere Virulenzfaktorgene ausgestattet waren. Nur ein Isolat war mit *fae* als Fimbriungen assoziiert. In 8,3 % der Fälle konnte die Sequenz von *est-Ib* zusammen mit der von *est-II* isoliert werden, in 5 % der Isolaten mit der von *elt-Ia* und in 5,8 % mit beiden gemeinsam.

Est-II konnte mittels PCR in 34,7 % der Isolate nachgewiesen werden, wobei in 15,7 % der Fälle *est-II* Sequenzen allein auftraten. Auch hier war nur ein Isolat mit einem Adhäsionsfaktorgen (*fae*) ausgestattet.

In diesem Versuch zeigten 20,7 % der isolierten *E. coli* Sequenzen von *elt-Ia*, und 5,8 % wiesen *elt-Ia* als unkombiniertes Faktorgen auf. Weitere 5,0 % waren mit *est-Ib* Sequenzen kombiniert, während wiederum 5,8 % mit beiden hitzestabilen Enterotoxingenen gemeinsam nachgewiesen werden konnten.

Nur 3 Isolate (2,5 %) waren in der PCR *stx2e* positiv, wobei ein Isolat mit *est-II* allein, eines mit *est-Ib* und *elt-Ia*, sowie ein weiteres mit Sequenzen von *est-Ib*, *est-II* und *elt-Ia* assoziiert war. Nur ein Isolat zeigte bei *fae* ein positives Ergebnis. Dieses wies außerdem Sequenzen beider hitzestabilen Enterotoxine auf. Das Gen für F18 konnte in den Kotproben der Sauen nicht nachgewiesen werden.

Um einen genaueren Überblick über die Verbreitung der pathogenen *E. coli* in den Stallanlagen zu erhalten wurden die Ergebnisse der Ferkel entsprechend der Anordnung in den Flatdecks dargestellt (Abbildung 11).

1	E S S S L L S S S L L L X	S S E E S E E E S L L S S S L L F	26
2	L L L S S X A	S L E E E E E E S L S S S L L L F F	25
3	L L A	L S E E E E E F S S S S S F L L L L L F	24
4	S S S S S S S S F F F F F F F L F	S S E E E E E E L F S S S S S S F L L L L L L L F F F F F F F F	23
5	leer	E A E S E E E E A A S S S S S A F F L A	22
6	E A	E A A A A A E E E A A A	21
7	E S S S S S S S S S F F F F F F F F F	E A A A A E L L L E A A A A S A	20
8	S S S S S S S X S F F F F F F F X A	A A E E E L L E E E S S S A A S S S A A A	19
9	E S X S F	E E E S E E E S E E A A A A S S A A	18
10	S L A A S A	leer	17
11	E A A A A A A L L A A	leer	16
12	E A A A A A A E A	leer	15
13	A A A A A E L L A A A	leer	14

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Verteilung schweinepathogener *E. coli* in den Flatdecks des Ferkelaufzuchtstalles des Instituts für Tierernährung

E = *est-Ib*, **S** = *est-II*, **L** = *elt-Ia*, **X** = *stx2e*, **A** = *fedA*, **F** = *fae*

Die Buchstaben in einer schematischen Ferkelbox senkrecht betrachtet bezeichnen die in einem Isolat nachgewiesenen Pathogenitätsfaktorgene.

Von insgesamt 26 Ferkelboxen waren 21 Flatdecks belegt. Die Untersuchung der Kotproben ergab tendenziell eine Zunahme der Anzahl der *E. coli* Isolate pro Box und der Anzahl von Pathogenitätsfaktoren pro Isolat entlang der Boxennummerierung von eins bis 26, wobei die Zunahme nicht konstant erfolgte. Dennoch erschienen die meisten Isolate, ausgestattet mit einer größeren Zahl von Fimbrien- und Toxingenen, im Bereich der Boxen 18 bis 26.

4.5 Vergleichender qualitativer Nachweis ausgesuchter *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren im Darmtrakt von Ferkeln nach Einsatz von *B. cereus* var. *toyoi*

Mittels Multiplex PCR und nachfolgender Hybridisierung mit internen Oligosonden wurden die gewonnenen mucosalen DNA-Extrakte auf das Vorhandensein von ETEC/STEC-Virulenzfaktoren untersucht. Als Beispiel ist in Abbildung 12 der Nachweis von *est-Ib* aus mucosalen DNA-Extrakten mittels Hybridisierung mit einer internen Oligonukleotidsonde dargestellt.

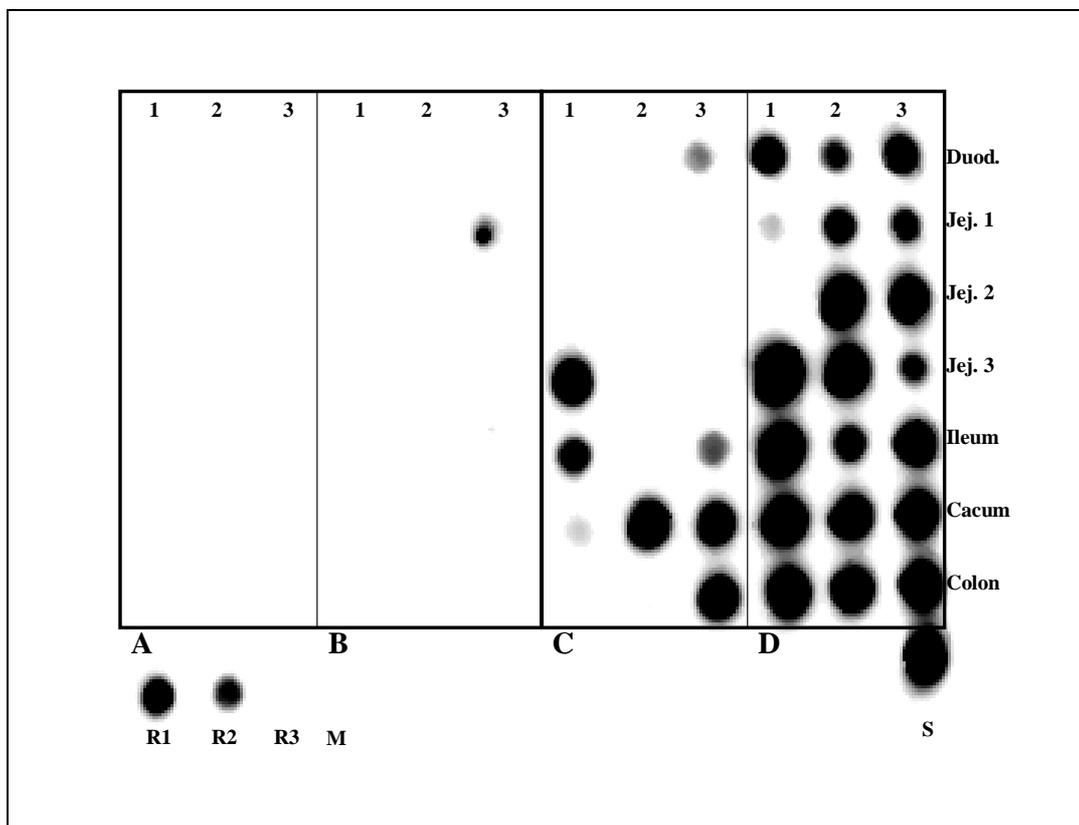


Abbildung 12: Nachweis von *est-Ib* in mucosalen DNA-Extrakten von Ferkeln mittels einer Multiplex PCR und nachfolgender Hybridisierung mit einer internen Oligonukleotidsonde

A, 28. Lebenstag, Kontrollgruppe; B, 28. Lebenstag, Versuchsgruppe; C, 32. Lebenstag, Kontrollgruppe; D, 32. Lebenstag, Versuchsgruppe

1,2,3 – Tier 1, Tier 2, Tier 3

R1, DNA aus O9:K35:K99; R2, DNA aus O138:K81; R3, DNA aus O147:K89:K88

M, Mastermix leer; S, DIG-Standard

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse zum qualitativen Nachweis ausgesuchter *E. coli* Pathogenitätsfaktoren im Darmtrakt von Ferkeln nach Einsatz von *B. cereus* var. *toyoi* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unter verschiedenen Gesichtspunkten tabellarisch dargestellt.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse nach Tierzahl zusammengefaßt. Das Gen für das hitzestabile Enterotoxin II konnte im Versuchsverlauf bei 13 Tieren nachgewiesen werden. Am 21. Lebenstag waren in der Kontrollgruppe, sowie am 32. Lebenstag in der Versuchsgruppe alle Tiere betroffen. Ein erhöhtes Vorkommen von *est-II* zeigte sich in der Zeit vor dem Absetzen.

Das Gen für das hitzestabile Enterotoxin I zeigte sich im Verlauf des Versuches bei 12 Tieren, wobei vier Tage nach dem Absetzen bei allen Tieren der Nachweis geführt wurde. Am 28. Tag, zum Zeitpunkt des Absetzens, zeigte kein Ferkel bezüglich dieses Toxingens ein positives Ergebnis. Das Gen für F5 konnte lediglich bei drei Tieren, die alle der Kontrollgruppe des 32. Lebenstages angehörten, nachgewiesen werden. Ein deutlich höheres Auftreten zeigte sich beim Nachweis des Gens für das hitzelabile Enterotoxin I. Einundzwanzig Tiere waren *elt-Ia* positiv. Nur am 21. Tag und am 32. Tag wurde in der Versuchsgruppe *elt-Ia* nicht in allen Tieren nachgewiesen. Der Nachweis von *fedA* beschränkte sich auf insgesamt drei Tiere des 32. Lebenstages, wobei zwei der Versuchsgruppe angehörten. *Fas* ließ sich in erster Linie bei den Ferkeln bis zum 21. Lebenstag nachweisen, wobei in der Kontrollgruppe des 13. Lebenstages alle Tiere betroffen waren. Der Nachweis von *fimf41* gelang mittels der PCR bei keinem der Tiere. *Stx2e* fand sich bei drei Ferkeln. Zwei gehörten zur Kontrollgruppe des 13. Lebenstages, eines zur Versuchsgruppe des 32. Lebenstages. Die Anzahl der unterschiedlichen, innerhalb einer Gruppe detektierten Pathogenitätsfaktoren schwankte zwischen fünf verschiedenen Faktoren am 13. Lebenstag in der Kontrollgruppe und drei Faktoren in der Kontrollgruppe des 28. Lebenstages. Zum Zeitpunkt des Absetzens konnte in Tieren der Versuchsgruppe nur *elt-Ia* nachgewiesen werden. Kontroll- und Versuchsgruppe unterschieden sich nicht hinsichtlich der Verteilung an Pathogenitätsfaktoren; die Tiere der Versuchsgruppe zeigten jedoch im Versuchsverlauf weniger *E. coli* Pathogenitätsfaktoren vor dem Absetzen.

Im gesamten Versuch wurde bei 21 Tieren *elt-Ia*, bei 13 Tieren *est-II* und bei 12 Tieren *est-Ib* nachgewiesen. *Stx2e* zeigten nur drei von 24 Tieren. Zehn Ferkel wiesen *fas* auf, jeweils bei drei Tieren wurden *fan* oder *fedA* nachgewiesen. Kein Ferkel wies *fimf41* positive Proben auf (Tabelle 14).

Tabelle 14: Anzahl von Ferkeln mit positivem Ergebnis hinsichtlich der untersuchten *E. coli* Pathogenitätsfaktoren in mucosalen DNA Extrakten nach Einsatz von *B. cereus* var. *toyoi*,
(n = 24)

	13 Tag		21. Tag		28. Tag		32. Tag		gesamt
	Kontroll- gruppe	Versuchs- gruppe	Kontroll- gruppe	Versuchs- gruppe	Kontroll- gruppe	Versuchs- gruppe	Kontroll- gruppe	Versuchs- gruppe	
<i>est-II</i>	2	2	3	2	1	0	0	3	13
<i>est-Ib</i>	1	1	2	2	0	0	3	3	12
<i>fan</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	3
<i>elt-Ia</i>	3	3	3	1	3	3	3	2	21
<i>fedA</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	3
<i>fas</i>	3	2	2	2	1	0	0	0	10
<i>fimf41</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>stx2e</i>	2	0	0	0	0	0	0	1	3
gesamt	11	8	10	7	5	3	10	11	

Bei der Betrachtung der Verteilung der Pathogenitätsfaktoren entlang der Darmabschnitte fällt auf, daß *E. coli* Pathogenitätsfaktoren bei einigen Tieren oft ausschließlich im Dickdarm nachgewiesen wurden und sich somit nicht nur auf den Dünndarm beschränkten (Tabelle 15).

Für *est-II* zeigten sich die größten Belastungen am 21. und 32. Lebenstag, wobei die Probiotikum-supplementierte Gruppe des 32. Tages die höchste Anzahl positiver Proben aufwies. Hier war dieses Toxigen in allen Darmabschnitten nachweisbar.

Das Gen des hitzestabilen Enterotoxins I war hauptsächlich vier Tage nach dem Absetzen nachweisbar, wobei die Verteilung entlang des Darmtraktes bei den Tieren der

Versuchsgruppe ausgeprägter erscheint. Am 28. Lebenstag konnte *est-Ib* in keiner Probe nachgewiesen werden.

Das Gen für F5 fand sich nur in der Kontrollgruppe des 32. Lebenstages. Bei den drei Ferkeln wurde *fan* in fünf Proben nachgewiesen. Drei davon stammten aus dem Dickdarm.

Das am häufigsten nachgewiesene Virulenzfaktorgen war *elt-Ia*. Bei den jüngeren Tieren konnte es in erster Linie in den Dünndarmabschnitten nachgewiesen werden. Das LT I Gen war vorwiegend am 13. Lebenstag und am 21. Lebenstag nachweisbar, wobei vermehrt Proben aus der Kontrollgruppe in der PCR positive Ergebnisse zeigten. Am 32. Tag konnte es hier in Dick- und Dünndarm gleichermaßen und in der Gruppe mit *B. cereus* Zulage in einer kleinen Probenzahl ausschließlich im Dickdarm gezeigt werden.

Das Gen für das F18 Fimbrium *fedA* wurde vier Tage nach dem Absetzen erstmalig nachgewiesen. Der Schwerpunkt lag in der Versuchsgruppe, wo es in Dün- und Dickdarm gleichermaßen vorlag. Die Kontrollgruppe wies im Caecum eine positive Probe auf.

In den Altersgruppen vom 13. Lebenstag bis zum Absetzen konnte mit abnehmender Intensität *fas* nachgewiesen werden. Zwischen den Gruppen gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Menge der positiven Proben. Bei allen Tieren stammten *fas* positive Proben vorwiegend aus dem Dünndarm, insbesondere aus dem Duodenum.

Der Nachweis von *stx2e* gelang bei zwei Proben aus der Kontrollgruppe des 13. Lebenstages und bei fünf Proben eines Tieres aus der Versuchsgruppe des 32. Lebenstages, wobei Dün- und Dickdarm gleichermaßen betroffen waren.

Keine Probe zeigte in der PCR ein *fimf41a* positives Ergebnis.

Tabelle 15: Verteilung ausgesuchter *E. coli* Pathogenitätsfaktoren in Proben aus dem Darmtrakt von Ferkeln nach Einsatz von *B. cereus* var. *toyoi* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bezüglich der Altersgruppen und Darmabschnitte

(n = 168)

	13 Tag		21. Tag		28. Tag		32. Tag	
	Kontroll Gruppe	Versuchs Gruppe	Kontroll Gruppe	Versuchs Gruppe	Kontroll Gruppe	Versuchs Gruppe	Kontroll Gruppe	Versuchs Gruppe
<i>est-II</i>	3	3	7	2	1	0	0	20
	2 x Caec., Col.	Jej., Duo., Ile.	3 x Jej., 2 x Duo. 2 x Caec	2 x Caec.	Duo.			8 x Jej., 3 x Duo., 3 x Ile., 3 x Caec., 3 x Col
<i>est-Ib</i>	1	1	2	2	0	0	8	20
	Jej.	Duo.	Jej., Duo.	Caec., Col.			Jej., Duo., 2 x Ile., 3 x Caec., Col.	8 xJej., 3 xDuo , 3 x Ile., 3 x Caec., 3 xCol.
<i>fan</i>	0	0	0	0	0	0	5	0
							Jej., Ile., 2 x Caec., Col.	
<i>elt-Ia</i>	10	6	13	1	9	4	9	3
	7 x Jej., Duo., 2 x Caec.	3 x Jej., Duo., 2 x Caec.	9 x Jej., 2 x Duo., 2 x Caec.	Jej.	3 x Jej., 2 x Duo., 2 x Ile., Caec., Col.	Jej., Duo., Ile., Caec.	3 x Jej., 2 x Duo., Ile., 2 x Caec., Col.	Caec., 2 x Col.
<i>fedA</i>	0	0	0	0	0	0	1	11
							Caec.	5 x Jej., Duo., 2 x Ile., 2 x Caec., Col.
<i>fas</i>	3	3	2	2	1	0	0	0
	3 x Duo.	Duo., 2 x Caec.	2x Duo.	Jej., Duo.	Duo.			
<i>fimf41</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>stx2e</i>	2	0	0	0	0	0	0	5
	Jej., Col.							Jej., Duo., Ile., Caec., Col.
gesamt	18	13	24	7	11	4	23	59

Duo.= Duodenum; Jej.= Jejunum; Ile.= Ileum; Caec.= Caecum; Col.= Colon

In der Übersicht soll noch einmal die Verteilung der Virulenzfaktoren entlang des Darmtraktes und deren gleichzeitiges Auftreten in einer Probe verdeutlicht werden (Tabelle 16). Bei allen Tieren gelang der Nachweis bei mindestens einem der Pathogenitätsfaktorgene. Der häufigste alleinige Faktor war *elt-Ia*, gefolgt von *est-II*. Es kamen Kombinationen von zwei bis zu fünf Faktoren gleichzeitig vor. Die häufigste war *est-II/ est-Ib*, insbesondere am 32. Lebenstag, gefolgt von *elt-Ia/ fan*, die insbesondere bei den jüngeren Ferkeln eine Rolle spielte. *Est-II /est-Ib/ fedA*, die in dieser Form erst nach dem Absetzen auftauchte, war die dritthäufigste Kombination. Die Kombination der Gene der beiden hitzestabilen Enterotoxine mit *fedA* und *stx2e* trat bei nur einem Tier des 32. Lebenstages in drei Darmabschnitten auf. In zwei weiteren Darmabschnitten waren diese vier Faktoren noch zusätzlich mit dem Gen des hitzelabilen Enterotoxins I kombiniert. In fünf Fällen konnte *est-II* mit *elt-Ia* gemeinsam nachgewiesen werden. In zwei Fällen kam die Kombination aller Enterotoxingene mit *fas* vor. Mit der gleichen Häufigkeit konnte das Gen des hitzestabilen Enterotoxins I mit dem des hitzelabilen Enterotoxins vorgefunden werden. Häufiger war *est-Ib* jedoch mit *fan* kombiniert. In dieser Darstellung wird die plötzliche Erhöhung des Auftauchens von Virulenzfaktoren vier Tage nach dem Absetzen deutlicher. Hier waren insbesondere in der Gruppe mit Probiotikum-Zulage in allen Darmabschnitten mehrere Virulenzfaktorgene in Kombination miteinander zu finden. Dagegen wirkte die Verteilung der Faktoren in den Altersgruppen vor dem Absetzen eher sporadisch, insbesondere durch die Tendenz des vergleichsweise geringen Vorkommens im Jejunum und im Ileum.

Tabelle 16: Übersicht zur Verteilung von *E. coli*-Pathogenitätsfaktorgenen in mucosalen DNA-Extrakten aus dem Darmtrakt von Ferkeln nach Einsatz von *B. cereus* var. *toyoi* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe dargestellt nach Einzeltieren und Darmabschnitten

Darmabschnitt			Duodenum	Jejunum 1	Jejunum 2	Jejunum 3	Ileum	Caecum	Colon
13 Lebens-tag	Kontroll- gruppe	Tier 1	<i>elt-Ia, fas</i>	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	<i>est-II, elt-Ia</i>	<i>est-II, stx2e</i>
		Tier 2	<i>fas</i>	<i>est-Ib, stx2e</i>	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	<i>est-II</i>	-
		Tier 3	<i>fas</i>	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	-	<i>elt-Ia</i>	-
	Versuchs- gruppe	Tier 1	<i>est-II, est-Ib, elt-Ia, fas</i>	-	<i>elt-Ia</i>	-	-	<i>elt-Ia, fas</i>	-
		Tier 2	-	<i>elt-Ia</i>	-	<i>est-II</i>	<i>est-II</i>	<i>elt-Ia, fas</i>	-
		Tier 3	-	-	-	<i>elt-Ia</i>	-	-	-
21. Lebens-tag	Kontroll- gruppe	Tier 1	<i>elt-Ia, fas</i>	<i>est-Ib, elt-Ia</i>	<i>est-II, elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	<i>elt-Ia</i>	-
		Tier 2	<i>est-II, est-Ib, elt-Ia, fas</i>	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	<i>est-II</i>	-
		Tier 3	<i>est-II</i>	<i>est-II, elt-Ia</i>	<i>est-II, elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	<i>est-II, elt-Ia</i>	-
	Versuchs- gruppe	Tier 1	<i>fas</i>	-	-	-	-	-	-
		Tier 2	-	-	-	<i>elt-Ia, fas</i>	-	<i>est-II, est-Ib</i>	-
		Tier 3	-	-	-	-	-	<i>est-II</i>	<i>est-Ib</i>
28. Lebens-tag	Kontroll- gruppe	Tier 1	<i>elt-Ia</i>	-	<i>elt-Ia</i>	-	-	<i>elt-Ia</i>	-
		Tier 2	<i>est-II</i>	<i>elt-Ia</i>	-	-	<i>elt-Ia</i>	-	-
		Tier 3	<i>elt-Ia, fas</i>	-	-	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	<i>elt-Ia</i>
	Versuchs- gruppe	Tier 1	<i>elt-Ia</i>	-	-	-	<i>elt-Ia</i>	-	-
		Tier 2	-	-	<i>elt-Ia</i>	-	-	-	-
		Tier 3	-	-	-	-	-	<i>elt-Ia</i>	-
32. Lebens-tag	Kontrollgruppe	Tier 1	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	<i>est-Ib, fan</i>	<i>est-Ib, fan</i>	<i>est-Ib, elt-Ia</i>	-
		Tier 2	<i>elt-Ia</i>	<i>elt-Ia</i>	-	-	<i>elt-Ia</i>	<i>est-Ib, fan, elt-Ia, fedA</i>	-
		Tier 3	<i>est-Ib</i>	-	-	<i>elt-Ia</i>	<i>est-Ib</i>	<i>est-Ib, fan</i>	<i>est-Ib, fan, elt-Ia</i>
	Versuchsgruppe	Tier 1	<i>est-II, est-Ib</i>	<i>est-II, est-Ib</i>	<i>est-II</i>	<i>est-II, est-Ib</i>	<i>est-II, est-Ib</i>	<i>est-II, est-Ib</i>	<i>est-II, est-Ib</i>
		Tier 2	<i>est-II, est-Ib, fedA, stx2e</i>	<i>est-II, est-Ib, fedA</i>	<i>est-II, est-Ib, fedA</i>	<i>est-II, est-Ib, fedA, stx2e</i>	<i>est-II, est-Ib, fedA, stx2e</i>	<i>est-II, est-Ib, elt-Ia, fedA, stx2e</i>	<i>est-II, est-Ib, elt-Ia, fedA, stx2e</i>
		Tier 3	<i>est-II, est-Ib</i>	<i>est-II, est-Ib, fedA</i>	<i>est-II, est-Ib</i>	<i>est-Ib, fedA</i>	<i>est-II, est-Ib, fedA</i>	<i>est-II, est-Ib, fedA</i>	<i>est-II, est-Ib, elt-Ia</i>