

## 5 Diskussion

### 5.1 Methode

#### 5.1.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Proben der Darmmucosa von Ferkeln

Die hier angewandte Extraktionsmethode ermöglicht, aus grampositiven und gramnegativen Bakterien, sowie aus komplexen Proben DNA und RNA simultan zu extrahieren. Sie wurde bereits zuvor erfolgreich zur DNA- und RNA-Gewinnung aus Mucosaproben eingesetzt (Gollnisch *et al.*, 1999, Vahjen *et al.* 2000).

Die als Probe eingesetzte porcine Mucosa ist gekennzeichnet durch einen hohen Proteingehalt (Membranproteine, intrazelluläre Proteine). Die Rohprobe von 0,5 g Mucosa entspricht bei 35 Tage alten Ferkeln (n=12) einer Fläche von ca. 8 bis 15 cm<sup>2</sup>, wobei die Flächenzunahme von proximal nach distal erfolgt. Das Caecum weist dabei die größte Fläche/g Mucosa auf.

Die Reinheitswerte der DNA-Extrakte erfüllen im Wesentlichen die Anforderungen, die an Proben gestellt werden, die für die PCR Verwendung finden sollen. Ein Reinheitsgrad von 1,8 bis 2,0 sollte nicht unterschritten werden, da durch einen hohen Anteil an Proteinen in der Probenlösung eine Hemmung der Polymerase erfolgen kann. Die Unregelmäßigkeiten bei der Reinheit der Extrakte erscheinen zunächst zufällig. Allerdings scheinen mucosale Dickdarmproben im Mittel einen höheren Proteingehalt aufzuweisen als Dünndarmproben. Es ist möglich, dass in einigen Fällen die Kapazität des Phenols, Proteine zu fällen überschritten wurde. Im Dickdarm, insbesondere im Caecum befinden sich bei gleicher Probeneinwaage eine Vielzahl mehr an mucosalen Zellen, sowie Bakterien und deren Enzyme, was den Proteingehalt der Urprobe stark in die Höhe treiben kann. Sporadisch erhöhte Proteinwerte bei den Absorptionmessungen und die damit verbundene verringerte Reinheit einiger DNA-Extrakte wirkte sich hier nicht unbedingt auf den Ablauf der PCR aus, da auch die Amplifikate dieser Proben positive Signale in der Hybridisierung lieferten. Die mögliche Beeinträchtigung der Polymeraseaktivität kann

jedoch die Sensitivität der Hybridisierung herabsetzen, so dass in diesen Proben unter Umständen nicht alle Pathogenitätsfaktoren erfasst werden konnten.

Das Auftreten von ‚Ausreißern‘ in den DNA-Gehalten ist offenbar zufällig und möglicherweise in der großen Anzahl an Arbeitsschritten begründet. Dabei sind in einigen Arbeitsschritten Nukleinsäureverluste schwer zu vermeiden, was insbesondere die Ausreißer in den unteren Konzentrationsbereichen erklärt. So sammeln sich beispielsweise unzureichend aufgeschlossene Bakterienzellen während der Phenolextraktion in der Interphase. Teile des DNA-Zentrifugates können sich während der Alkoholfällung vom Boden lösen, in den Überstand übergehen und werden so unbesehen abgegossen.

Der DNA-Gehalt von Mucosaprobe steht in engem Zusammenhang mit der Anzahl und Mitoserate der Zellen des Darmepithels und der zellulären Immunabwehr, sowie mit dem bakteriellen Status der Probe. Die Untersuchung zeigt, dass im Saugferkelalter die Kontrollgruppe höhere DNA-Gehalte aufweist als die Probiotikumgruppe. Mit der Aufnahme festen Beifutters kehren sich diese Verhältnisse tendenziell, mit wachsendem Alter der Tiere jedoch zunehmend um. Mikrobiologische Untersuchungen an den gleichen Proben haben ergeben, dass insbesondere vor dem Absetzen die Kontrollgruppe eine höhere Gesamtkeimzahl aufwies (Jadamus *et al.*, 2000). Der Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen im frühen Alter könnte zum Teil darauf zurückzuführen sein. Mit zunehmendem Alter und so also auch mit zunehmender Aufnahme des probiotisch wirksamen Keimes, weisen jedoch die Vertreter der Versuchsgruppe zum Teil signifikant höhere DNA-Konzentrationen auf. Die Literatur weist darauf hin, dass Probiotika immunomodulatorisch wirksam sind, indem sie unter anderem die zelluläre Abwehr aktivieren (Zimmermann *et al.* 1997, Thelen, 1997, Kosaka *et al.*, 1998, Van Briel, 2002). Darüber hinaus zeigen vorhergehende Untersuchungen, dass Probiotika eine proliferative Wirkung auf die Darmzotten und die Epithelzellen von Ferkel ausüben (Klein und Schmidt, 1997). Die damit verbundene Erhöhung der wirtseigenen DNA könnte insbesondere im Falle der Immunzellen eine Erklärung für die vorübergehend höheren DNA-Konzentrationen sein. Die oftmals beschriebene Verringerung der Enterobacteriaceae Keimzahl in der Saugferkelperiode (Kirchgessner *et al.*, 1993; Jadamus *et al.*, 2000) in Kombination mit der zunehmend immunostimulierenden und epithelzellproliferativen Wirkung von Probiotika könnte eine Erklärung für die hier festgestellten Veränderungen in den DNA- Gehalten der Mucosaprobe sein.

Insofern, dass eine Unterscheidung zwischen wirtseigener und bakterieller DNA hier nicht getroffen werden kann, ist eine Aussage allein über den bakteriellen Status einer Darmprobe anhand des Gesamt-DNA-Gehaltes kaum zulässig. Die hier dargestellte Extraktion von Nukleinsäuren und die anschließende Anwendung molekularbiologischer Verfahren bieten im Vergleich zu mikrobiologischen Methoden den Vorteil, dass bei Einhaltung der Kühlkette während der einzelnen Arbeitsschritte das bakterielle Status quo der Proben zum Zeitpunkt der Gewinnung erhalten bleibt und lange lagerungsfähig ist. Darüber hinaus könnten einige der hier untersuchten Faktoren während der Kultivierung verloren gehen (Karch *et al.* 1992). Es stehen weniger komplizierte Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren zur Verfügung als die hier angewandte, die allerdings nicht dieses Spektrum an unterschiedlichen Bakterien abdecken können. Viele sind nicht zur simultanen Gewinnung von DNA und RNA geeignet. Die hier angewandte Methode ist zwar anfälliger für Fehler, aber sehr effektiv und vielseitig hinsichtlich der Art des eingesetzten Probenmaterials. Sie ermöglicht die simultane Diagnostik hinsichtlich des qualitativen Nachweises spezifischer Gensequenzen durch Vervielfältigung mittels der PCR und der Bestimmung der biologischen Aktivität bakterieller Gruppen durch die Hybridisierung der 16S RNA (in dieser Arbeit nicht gezeigt) in ein und derselben Probe.

## 5.1.2 PCR und Hybridisierung

### 5.1.2.1 Optimierung der Multiplex PCR

Die PCR ist die enzymatische *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Werden in einem Reaktionsansatz mehr als eine Ziel-DNA-Sequenz vervielfältigt spricht man von einer Multiplex PCR (MPCR), zu deren Ablauf entsprechend viele Primerpaare notwendig sind.

Aufgrund der Schwierigkeit bei der Schaffung von für alle Primer optimalen Reaktionsbedingungen, kann es vorkommen, dass einzelne Zielsequenzen bei der Amplifikation bevorzugt oder benachteiligt werden, so dass das mittels einer MPCR gewonnene Produkt prinzipiell keiner aussagekräftigen quantitative Analyse unterzogen werden kann (Pass, Odedra und Batt, 2000). In unserer Untersuchung betrug die geringste Konzentration eingesetzter Ziel-DNA aus Referenzstämmen, die nach der MPCR in der Agargelelektrophorese (AGE) die Darstellung aller den einzelnen Stämmen entsprechenden Pathogenitätsfaktorgene ermöglichte, 1 pg. Aus  $10^9$  *E. coli*-Bakterien lassen sich laut Angaben aus der Literatur 17 µg DNA isolieren (Schulz *et al.*, 1999). Demnach entspräche der Nachweis von 1 pg *E. coli*-DNA der Zahl von ca. 60 Bakterien. Die Darstellung mittels Hybridisierung zeigte in Abhängigkeit vom Pathogenitätsfaktor sogar eine Sensitivität von einem bis 10 fg DNA. Dies weist auf ein besonderes Problem hin, das sich möglicherweise aus der Tatsache ergibt, dass acht dieser Faktoren plasmidcodiert sind und in dieser Form als eine größere Anzahl Kopien pro *E. coli*-Zellen vorliegen, so dass die Anzahl der so nachgewiesenen ‚Zellen‘ Schwankungen unterworfen sein kann und auf diesem Weg nur ungenügend zu bestimmen ist. Dies ist ein Grund, warum sich die MPCR in diesem Fall ebenfalls nicht zur Quantifizierung von Bakterien in Proben eignet. Beim Nachweis mehrerer plasmidcodierter Gensequenzen kann je Sequenz eine unterschiedliche Anzahl an Plasmidkopien pro Bakterienzelle vorliegen, die sich in der MPCR exponentiell vervielfachen und somit ebenfalls eine quantitative Analyse von Virulenzfaktoren erschweren.

Die Optimierung der Primerkonzentration für die MPCR mußte für beide verwendeten Thermocycler durchgeführt werden. Die empirisch bestimmten Konzentrationen

unterschieden sich um  $0,1 \mu\text{M}$  voneinander. Hierbei ist zu bedenken, dass unterschiedliche Heizraten und Geschwindigkeiten, mit der ein Cycler die erforderliche Temperatur erreicht, eine Rolle spielen können. In diesem Fall war der T1-Cycler mit einer schnelleren Temperaturüberbrückung ausgestattet, was möglicherweise einen Einfluß auf die Bindungsintensität der Primer und die enzymatische Aktivität der Polymerase hat.

Bezüglich der Beobachtung, dass die höhere, ermittelte Primerkonzentration von  $0,6 \mu\text{M}$  im Gegensatz zur geringeren Konzentration eine verringerte Menge an Amplifikat liefert, scheint die Überlegung nahezuliegen, dass insbesondere in Multiplex PCR Reaktionsansätzen die Wechselwirkungen der Primer untereinander mit steigender Konzentration zunehmen. Solange wie hier dargestellt die Menge an eingesetzter Template-DNA konstant bleibt, steigt womöglich mit der eingesetzten Primerkonzentration die Wahrscheinlichkeit, dass sich komplementäre Sequenzen der Primer aneinanderlagern und auf diesem Wege hemmend auf die Amplifikation der Zielsequenz wirken.

Zur Optimierung der Annealingtemperatur wurde das Cyclerprogramm jeweils so abgeändert, dass pro Optimierungsschritt zunächst  $53^\circ\text{C}$ ,  $54^\circ\text{C}$  und  $55^\circ\text{C}$  erreicht wurden. Diese Werte sind lediglich ein Kompromiss zu den um bis zu  $4^\circ\text{C}$  differierenden  $T_m$ -Werten der Primer, so dass die Optimierung letztlich nur den Temperaturbereich empirisch ermittelt, der für die größte Zahl der Primer eine Anlagerung ermöglicht. Dabei ist davon auszugehen, dass die Temperaturoptima nicht in jedem Fall erreicht werden.

Die Beobachtung, dass sich in der Gelelektrophorese nicht alle Pathogenitätsfaktoren mit derselben Bandenintensität darstellen ließen, hatte vermutlich verschiedene Ursachen. Zum einen ist der Großteil dieser Faktoren plasmidcodiert, so dass möglicherweise nicht überall die gleiche Ausgangsmenge an Template-DNA eingesetzt wurde. Andererseits kann die Möglichkeit der Bildung von Primerdimeren bei einigen Primern aufgrund ihrer besonderen Struktur nicht ausgeschlossen werden. Auf diese Weise würden also immer wieder dieselben Primer aus der Reaktion entfernt, ohne an der Bildung von Amplifikat beteiligt gewesen zu sein. Die Polymerase elongiert dementsprechend also bevorzugt die Zielsequenzen, deren Primer nicht miteinander sondern mit der Ziel-DNA interagieren. Dagegen erscheint es eher unwahrscheinlich, dass nach erfolgter Denaturierung die

Gensequenzen bestimmter Faktoren selbst Sekundärstrukturen bilden und so die Anlagerung der Primer und die enzymatische Elongation dieser Faktoren verringert wird.

Bei der Kombination von DNA aus Referenzstämmen und DNA aus Referenzstämmen, ohne hier zu untersuchenden Pathogenitätsfaktor, wurde deutlich, dass die Amplifikation der Virulenzfaktoren nicht gleichermaßen gehemmt wird. Einzelne Faktoren, wie F5 konnten überhaupt nicht nachgewiesen werden. *Fae* (F4) und *fedA* (F18) konnten nur bis zu einem Nanogramm Template-DNA gezeigt werden, während *elt-Ia* (LT I) bis zu 10 pg deutliche Banden lieferte. Hier wird möglicherweise die eingangs beschriebene Problematik, der unterschiedlichen Kopienzahl bei plasmidcodierten Faktoren eine Rolle spielen. Ein weiteres Phänomen war die teilweise höhere Bandenintensität bei geringerem Gehalt an Referenz-DNA. Es ist bekannt, dass zu hohe DNA-Konzentrationen die Sensitivität und Spezifität der PCR herabsetzen, insbesondere weil es zu einer Zunahme von Fehlhybridisierungen kommen kann und sich dadurch bei Polymerasen ohne 3'-5'-Exonucleaseaktivität fehlerhafte PCR-Produkte vermehren, während die Bildung von spezifischen Amplifikaten gehemmt wird (Mülhardt, 1999). Der Einsatz von Mucosaproben, die im Vergleich zur DNA aus *E. coli* Stämmen zusätzlich eine große Menge Fremd-DNA beinhalten, in eine MPCR findet dort ihre Grenzen, wo ein quantitativer Nachweis gefordert wird. Sie ist in dieser Arbeit aufgrund der Möglichkeit, dass sich die große Anzahl in die PCR eingesetzter Primer gegenseitig beeinflussen und so bestimmte Faktoren bevorzugt oder benachteiligt amplifiziert werden als Überblick auf ein Status quo der Verhältnisse im Ferkeldarm aufzufassen. Zur Bestimmung der genauen Menge bestimmter Pathogenitätsfaktoren im Sinne einer quantitativen Analyse ist dieses MPCR-System mit großer Wahrscheinlichkeit zu ungenau.

Der Test verschiedener PCR-Systeme verlief zu Ungunsten der Touchdown PCR. Sie zeigte zwar eine höhere Amplifikatmenge als das Touchup-System, aber auch eine größere Zahl unspezifischer Produkte. Dies ist recht ungewöhnlich, da beim Touchdown aufgrund der höheren Ausgangstemperatur die Wahrscheinlichkeit von Fehlhybridisierungen gesenkt werden sollte. Möglicherweise ist bezüglich der Amplifikatmenge die Ursache im Vorhandensein von 18 unterschiedlichen Primern der MPCR zu suchen, die bei den niedrigen Ausgangstemperaturen der Touchup PCR ein größeres Maß an Interaktionen zeigen und so der Amplifikatbildung nicht mehr zur Verfügung stehen. Während der Optimierung einer PCR ist es nach den Erfahrungen

dieser Untersuchung in jedem Fall lohnend, neben der empirischen Ermittlung der Sensitivität, der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur auch alternative PCR-Programme zu testen.

Die Darstellung der Amplifikate aus den Mucosaprobe führte bei der AGE zur Bildung von Schmierbanden, so dass eine optische Differenzierung der Pathogenitätsfaktoren teilweise nicht möglich war. Dies könnte ein Phänomen sein, das sich aufgrund des hohen Anteils an Fremd-DNA ergibt, die auch bei der Elektrophorese störend wirkt. Die Darstellung mittels interner Oligosonden bei der Hybridisierung war jedoch ohne Einschränkung möglich, so dass das MPCR-Verfahren in Kombination mit der Hybridisierung eine gute Methode zur sensitiven, qualitativen Analyse von aus Darmmucosa extrahierten, bakteriellen DNA-Sequenzen darstellt.

#### 5.1.2.2 Optimierung der Hybridisierung

Der Test zweier unterschiedlicher Hybridisierungspuffer lieferte für den kommerziellen Puffer deutlich schwächere Signale, wobei bei zwei Sonden die beim SSC-SDS-Puffer gezeigte Sensitivität von 100 fg in die PCR eingesetzte Referenz-DNA nicht erreicht wurde. Die Hybridisierungstemperaturen waren in beiden Fällen gleich. Obwohl formamidfrei wird DigEasyHyb von der Firma Roche bei der Berechnung der Temperatur wie ein formamidhaltiger Puffer mit 50 % Formamid behandelt. Die Hybridisierungstemperatur liegt demnach 20 °C bis 25 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Sonden. Dieses Verfahren soll bei Sonden mit hohen  $T_m$ -Werten den thermischen Abbau der aufgeblotteten Nucleinsäuren verringern. Trotz der mittels des Puffers stark erniedrigten Hybridisierungstemperatur wird das Auftreten unspezifischer Signale vermindert. Das wirkt sich bei Sonden mit einem vergleichsweise niedrigen  $T_m$ -Wert leider auch auf die Sensitivität aus. Der Einsatz eines solchen Puffers für Oligonukleotidsonden mit einem niedrigen  $T_m$ -Wert ist also von Nachteil, da der Schutz der aufgeblotteten Nucleinsäuren vor einem möglichen Abbau unnötig ist und der Verlust der Sensitivität so keinem Nutzen gegenübersteht.

Bei der Bestimmung der Sensitivitätsgrenze zeigten die Sonden kein einheitliches Verhalten. Das mag in erster Linie mit einem geringen Gehalt an spezifischer DNA für die

entsprechenden Sonden zusammenhängen. Die Pathogenitätsfaktoren an deren Zielsequenzen die Sonden, die in der Hybridisierung die schwächeren Signale zeigten, binden, zeigten alle auch in der Gelelektrophorese geringe Bandenintensitäten. Die Sensitivität der Hybridisierung liegt bei Einsatz von Referenz-DNA im Vergleich zum Nachweis der PCR-Produkte mittels AGE um den Faktor  $10^2 - 10^3$  niedriger. Mittels der Hybridisierung konnten nach der MPCR ein bis 10 fg DNA aus Referenzstämmen detektiert werden. Betrachtet man das chromosomal gebundene und in der Zelle somit als Unikat vorliegende Pathogenitätsfaktorgen *fimf41a*, so könnte das unter der Hypothese, dass sich aus  $10^9$  *E. coli* Zellen 17 µg DNA isolieren lassen (Schulz *et al.*, 1999), bedeuten, dass rechnerisch mittels der Hybridisierung weniger als 0,6 *fimf41a* tragende *E. coli*-Zellen nachgewiesen werden könnten.

Bezüglich der Untersuchung der Proben des Versuches zur Verteilung pathogener *E. coli* in den Versuchsanlagen zeigten sich die Signalintensitäten bei der Hybridisierung der PCR-Amplifikate gegen die Sonde für *elt-Ia* heterogen. Da einige Proben auch negative Ergebnisse zeigten und auch der ohne Probe eingesetzte Mastermix kein Signal erzeugte, liegt hier offenbar tatsächlich eine unterschiedliche Menge Ziel-DNA vor. Das hitzelabile Enterotoxin I ist wie viele der *E. coli* Pathogenitätsfaktoren plasmidcodiert. Es ist bekannt, dass Plasmide sich unabhängig vom eigentlichen bakteriellen Chromosom replizieren, so dass ihre Anzahl in der Bakterienzelle stark schwanken kann. Dies könnte womöglich die Ursache der unterschiedlichen Signalintensitäten in der Hybridisierung sein.

Die Hybridisierung der PCR-Produkte der mucosalen DNA-Extrakte mit der *fae*-Sonde lieferte zum Teil Unstimmigkeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der positiv reagierenden Proben. Während der Optimierung der *fae*-Sonde anhand von Referenz-DNA kam es zu keinen Problemen hinsichtlich der Spezifität oder der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Möglicherweise bot der hohe Fremd-DNA-Gehalt der mucosalen DNA-Extrakte eine Vielzahl ähnlicher Sequenzen, die bei einem geringen Maß an amplifizierter Zielsequenz für *fae* zu unspezifischen Hybridisierungen führte.

### 5.1.2.2 Optimierung der PCR zum Nachweis des fae-Gens

Bei der Ermittlung der für die PCR optimalen DNA-Menge ist zu bedenken, dass es sich nur bei einem geringen Anteil der eingesetzten DNA um Ziel-DNA handelt. Die Sensitivitätsgrenze wurde in dieser Untersuchung bei 50 ng mucosalem DNA-Extrakt unterschritten.

Bei geringen Primermengen im PCR-Ansatz sinkt die Häufigkeit mit der sich Ziel-DNA und der entsprechende Primer begegnen und führte in dieser Optimierung bei Primerkonzentrationen von 0,3  $\mu\text{M}$  und 0,4  $\mu\text{M}$  zu einer geringeren Produktbildung als bei höheren Primerkonzentrationen. Da die Primer dennoch an im Überfluß vorhandene ähnliche Sequenzen binden, zeigten sich zusätzlich unspezifische PCR-Produkte. Bei einem optimalen Primer-Target-Gleichgewicht sinkt die Gefahr von Fehlhybridisierungen der Einzelstränge. Ist die optimale Primerkonzentration überschritten, kommt es erneut zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte, da der Primerüberschuß zu Fehlanlagerungen führen kann, insbesondere solange in den anfänglichen Zyklen noch kein spezifisches Amplifikat vorliegt, das wiederum als Zielsequenz dient.

Auch niedrige Annealingtemperaturen begünstigen die unspezifische Anlagerung von Primern an DNA-Einzelstränge. Mit steigender Temperatur nehmen die Molekülbewegungen derart zu, dass nur die Doppelstränge mit nahezu komplementären Sequenzen verlängert werden. Hybride mit einem hohen Anteil falsch gepaarter Basen bleiben in der Regel nicht bestehen, so dass eine Erhöhung der Annealingtemperatur zu spezifischeren PCR-Produkten führen sollte. Das Auftreten unspezifischer Banden läßt sich also durch die Wahl stringenter Annealingtemperaturen verbessern. Die Grenze setzt hier allerdings der  $T_m$ -Wert der Primer, dessen Erreichen zu einer deutlichen Abnahme der Amplifikatmenge führt.

Bei der empirischen Bestimmung der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur ist die Komplexität der eingesetzten Probenart zu berücksichtigen. Selbst bei optimalen PCR-Bedingungen kann es bei Proben mit einem hohen Anteil Fremd-DNA zur Bildung unspezifischer Produkte kommen, die zunächst in Kauf genommen werden können,

solange sie aufgrund ihres Molekulargewichts auf dem Agarosegel nicht dessen Auswertbarkeit beeinflussen.

Das hier vorgestellte Verfahren zum Nachweis schweinepathogener *E. coli* erwies sich abschließend als schnelle und sensitive Methode, deren Schwächen einerseits in der großen Anzahl an Arbeitsschritten und er damit verbundenen Fehlerquellen und andererseits im Falle der MPCR in der langen Optimierungsdauer aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Primer lagen. Sie erlaubt insbesondere bei Einsatz von Isolaten einen raschen Überblick über deren Ausstattung mit Pathogenitätsfaktoren. Der Einsatz von Mucosaproben führt aufgrund des hohen Anteils an Fremd-DNA zu Interaktionen, welche die Sicherheit und die Sensitivität der Methodik zum Teil negativ beeinflussen können. Als schnellen und effizienten Einblick in den Status quo einer Probe bzw. in den Darm eines Tieres ist sie jedoch sehr gut geeignet. Eine quantitative Analyse erlaubt sie jedoch nicht.

## 5.2 Anwendung der MPCR

### 5.2.1 Fallstudie zum Vorkommen pathogener *E. coli* beim Ferkel

Die Untersuchung der aus einem an Durchfall erkrankten Absetzferkel kultivierten *E. coli* Isolate diente einerseits der Evaluierung der Methodik, andererseits dem Überblick über die in den Stallverhältnissen der Versuchsanlage vorherrschenden ETEC/STEC assoziierten Pathogenitätsfaktoren.

Im vorderen Verdauungstrakt zeigten sich insbesondere im Duodenum eine Vielzahl *est-Ib*, *est-II* und *elt-Ia*-positiver Isolate, die für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich sein können. Im Duodenum treten sie mit *fae* und *fan* kombiniert auf, die hier als Anheftungsfaktoren möglicherweise eine Rolle spielen. Dieser Trend setzt sich im Jejunum nur im dritten Abschnitt fort. In den beiden ersten jejunalen Abschnitten kam es offensichtlich nicht zu einer adäquaten Anheftung pathogener *E. coli*. Hier fällt insbesondere das Auftreten *fedA* positiver Isolate auf, die offensichtlich nicht mit einem entsprechenden Toxingen assoziiert sind. Im Ileum wurde bei einer Vielzahl von Isolaten *fedA* und *stx2e*, die als Verursacher der Ödemkrankheit in dieser Altersgruppe eine große Rolle spielen, nachgewiesen. Das Tier zeigte hinsichtlich der Wirkung des Shiga-like Toxins jedoch keine adäquate Symptomatik. Bosworth (1996) weist allerdings auf F18-tragende Stämme als Verursacher von Diarrhoe bei Absetzferkeln hin, solange dieses Fimbrium mit Enterotoxinen kombiniert auftritt. Für F18 wurden zwei unterschiedliche Typen (F18 ab/ ac) nachgewiesen, wobei der F18 ab Typ in erster Linie mit der Ödemkrankheit assoziiert war (Rippinger *et al.* 1995). In unserer Studie wurde kein Nachweis von Fimbrien des Typs F18 ac (2134P oder 8813) durchgeführt, so dass es sich vermutlich bei den nachgewiesenen Isolaten um STEC Stämme handeln könnte. Rippinger *et al.* relativierten ihre Aussage aber dahingehend, dass sie ein ETEC Isolat mit der Ausstattung F18 ac nachweisen konnten, so dass davon auszugehen ist, dass diese Zuordnung nicht in jedem Fall zutreffend sein könnte. Ein Auftreten von Symptomen, die der Ödemkrankheit eigen sind, wäre bei diesem Tier im weiteren Verlauf eventuell möglich gewesen. Diese Krankheit bricht in der Regel zehn Tage nach dem Absetzen aus (Bosworth, 1996). In diesem Fall wären aufgrund der in der vorliegenden Untersuchung molekularbiologisch ermittelten Befunde am siebten Tag nach dem Absetzen bereits

Tendenzen sichtbar. Die Kombination von *fedA* und *stx2e* positiven Isolaten setzt sich in Caecum und Colon fort, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Isolate zur Ausscheidung gelangen und das Keimspektrum im Stall beeinflussen. Zu einer eindeutigen Aussage hinsichtlich der Ausscheidung pathogener *E. coli* wäre allerdings eine Kotuntersuchung essentiell.

Der Vergleich mit den Ergebnissen der Untersuchung der Ferkelkotproben des Versuchs 2 ergibt im Falle des Auftretens von Isolaten mit *est-II*, bzw. den Kombinationen *est-Ib/fedA*, sowie *est-Ib/est-II/fedA* Übereinstimmungen, wobei der prozentuale Anteil an der Gesamtzahl der Isolate jedoch nicht stimmig ist. Hierbei ist zu bedenken, dass es sich im Falle des Versuchs 1 um Isolate aus mucosalen Proben verschiedener Darmabschnitte eines Tieres handelt, während die Ergebnisse des Versuchs 2 einen Querschnitt durch die von einer Vielzahl von Tieren ausgeschiedenen Isolate zeigt. Im ersten Fall wurde versucht, diejenigen Bakterien zu erhalten, die möglicherweise eine Anheftung und Etablierung im Darm des Ferkels erreicht haben und auf diese Weise das klinische Bild der Diarrhoe verursacht haben könnten. Im zweiten Fall wurde die Ausscheidung der Bakterien nachgewiesen, ohne jedoch Erkenntnisse darüber gewonnen zu haben, ob auch eine Etablierung im Darm mit nachfolgender Vermehrung stattgefunden hat. So gibt die Analyse der Darmproben des ersten Tieres durchaus Hinweise darauf, dass eine Infektion mit ETEC, unter der Einschränkung, dass keine weitere Diagnostik darmpathogener Erreger durchgeführt wurde, für die klinische Symptomatik ursächlich in Frage kommen könnte, während die klinisch gesunden Tiere des zweiten Versuchs bevorzugt als Ausscheider in Betracht kommen. Große Unterschiede ergeben sich zum Teil jedoch hinsichtlich des Vorkommens der Anheftungsfaktoren. Das Absetzferkeln des Versuchs 1 wies ausschliesslich *fedA* positive Isolate auf, wobei dort die Kombination mit *stx2e* im Vordergrund stand. Die Kotproben der Ferkel des zweiten Versuchs zeigten *fedA* seltener, und auch dann in erster Linie in Kombination mit den Genen für die Enterotoxine. Darüber hinaus wurde dort im Gegensatz zu dem Tier in Versuch 1, bei dem nur ein *fae* positives Isolat diagnostiziert wurde, oftmals *fae* in Kombination mit den Enterotoxingenen nachgewiesen, so dass der Verdacht nahe liegt, dass das klinisch erkrankte Einzeltier eine Kombination von F18 tragenden ETEC und STEC Stämmen aufwies, während die klinisch gesunden Ferkel des zweiten Versuchs in erster Linie ETEC Stämme ausschieden, die im Falle der vornehmlich F4 tragenden *E. coli* nicht für die Initialisierung der Diarrhoe des Einzeltieres in Betracht kommen können. Nun wurde in

der Versuchsdurchführung das erkrankte Ferkel mehrere Monate vor der Kotuntersuchung getötet, so dass sich ein direkter Zusammenhang in keinem Fall ergeben konnte. Es stellt sich aber die Frage, ob im Laufe der Monate Veränderungen im mikrobiologischen Klima der Stallanlagen stattgefunden haben könnten, so dass zur Klärung einer möglichen zeitlichen Dynamik eine Verlaufsuntersuchung angezeigt wäre.

### 5.2.2 Untersuchung der Verteilung schweinepathogener *E. coli* in den Versuchsanlagen

Insgesamt wurden 331 Isolate aus Kotproben von institutseigenen Sauen und Ferkeln auf das Vorhandensein von sechs *E. coli* Virulenzfaktoren untersucht.

Obwohl keines der Absatzferkel Anzeichen einer Magen-Darm-Infektion oder der Ödemkrankheit zeigten, war ein hoher Prozentsatz der aus den Kotproben gewonnenen Isolate in der MPCR positiv hinsichtlich einer oder mehrerer *E. coli* Pathogenitätsfaktoren. Das macht in anschaulicher Weise deutlich, dass in einem klinisch gesunden Bestand pathogene *E. coli* zur Ausscheidung gelangen und sich in der Umgebung der Tiere wiederfinden lassen. Durch Lecken und Benagen der Flächen, sowie durch direkte Aufnahme von Kot finden diese Erreger den oralen Wiedereintritt in den Schweinedarm, um dort eine weitere Tierpassage zu vollziehen.

Der häufigste nachgewiesene Faktor war *fedA* (F18). Da er in einer großen Zahl von Isolaten ohne Vorhandensein von Toxingenen vorkam, liegt die Vermutung nahe, dass diese Isolate ein Reservoir für diesen Faktor darstellen ohne jedoch die Fähigkeit zu besitzen, das Bild der PWD oder der Ödemkrankheit auszulösen. Osek *et al.* (1999) isolierten aus Schweinen mit PWD bzw. Ödemkrankheit *fedA* positive Stämme, von denen die meisten Beta-Hämolyse produzierten. Er vermutete, dass sich die genetischen Informationen auf gemeinsamen Pathogenitäts-DNA-Inseln befinden. Zwei der insgesamt 40 Stämme zeigten *fedA* ohne Kombination mit Enterotoxinen. Osek fand außerdem eine Vielzahl von Stämmen, die *fedA* gemeinsam mit den Genen der beiden hitzestabilen Enterotoxine trugen. Dies entspricht auch den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Der Anteil *stx2e* positiver Stämme lag bei Osek *et al.* allerdings wesentlich höher, was darauf hinweist, dass diese erst bei erkrankte Tieren eine gewisse Dominanz unter den *E. coli* Stämmen aufweisen. In einer späteren Studie zeigte Osek (2000), dass von 46 aus

Rektaltupferproben von an PWD erkrankten Absetzferkeln isolierten *E. coli* Stämmen 34 das Gen für Stx2e besaßen. In dem klinisch gesunden Ferkelbestand unseres Institutes zeigte sich diese Größenordnung nicht. Auffällig ist, dass auch Osek Stämme isolierte, die sowohl die genetische Information für die hitzestabilen Enterotoxine als auch für Stx2e gleichermaßen besaßen. Der Verdacht liegt nahe, dass diese Stämme in der Lage sind, sowohl eine enterische Colibazillose als auch die Ödemkrankheit auszulösen. Hide *et al.* (1995) fanden unter 480 hämolytischen *E. coli* Stämmen bei 62% das F107 Fimbriumgen (F18 ab). 25% der Stämme waren positiv für F107 und Stx2. Er weist darauf hin, dass sich eine große Zahl von Stämmen F107 positiv und Stx2 negativ verhielten, so dass beide Faktoren nicht notwendigerweise miteinander verbunden sein müssen.

Das Vorkommen *fae* (F4) positiver Isolate bei Absetzferkeln wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Osek (2000) weist darauf hin, dass dieses Fimbrium charakteristisch für Saugferkeldurchfälle sei. So waren auch alle 46 aus an PWD erkrankten Ferkeln isolierten Stämme negativ für F4. Eine Studie von 1999 ergab allerdings, dass bei abgesetzten an PWD erkrankten Ferkeln von 372 *E. coli* Isolaten 19 % in der PCR F4 positiv waren (Osek, 1999). Söderlind und Möllby (1979) zeigten, dass 56 % der insgesamt 300 Stämme aus Ferkeln mit Saugferkeldiarrhoe F4 positiv waren, während Stämme aus gesunden Ferkeln im Alter bis zu acht Wochen nur zu 3 % F4 positive Ergebnisse zeigten. Ojeniyi *et al.* (1994) hatten bei 22% von insgesamt 240 aus Absetzferkeln mit PWD isolierten Stämmen ein F4 positives Ergebnis. Garabal *et al.* (1997) wiesen bei 10 % von 88 Isolaten aus durchfallkranken Ferkeln F4 nach. Alle positiven Ergebnisse stammten aus Ferkeln, die älter als 15 Tage waren. Tatsächlich zeigten in unserer Studie fast 20 % der Isolate ein *fae* positives Ergebnis. Eine von Van den Broeck *et al.* (1999) durchgeführte serologische Untersuchung unterschiedlicher Zuchtbetriebe mit nicht vakkzinierten belgischen Jungsauen ergab ein zu 65 % positives Ergebnis für F4 mit sehr großen regionalen Unterschieden zwischen den belgischen Provinzen. Der Anteil F4 positiver Betriebe war umso höher, je größer der Anteil der Betriebe in einem Umkreis von 10 km war. Dieser Zusammenhang zwischen der Dichte der schweinehaltenden Betriebe und der Verbreitung offensichtlich ETEC induzierter F4 seropositiver Tiere macht möglicherweise klar, warum verschiedene Studien im Hinblick auf das Vorkommen von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Die großen regionalen Unterschiede in der Verbreitung der einzelnen Stämme sollten bedacht werden. Insbesondere im Zusammenhang mit F4 besteht die Möglichkeit

der genetischen Resistenz der Schweine. F4 tragenden *E. coli* wäre bei resistenten Tieren die Anheftung und somit die Etablierung im Darm verwehrt. Baker *et al.* (1997) fanden bei 96 Ferkeln aus vier Rassen einen Anteil an resistenten Tieren von 28 %.

Über 37 % der Isolate waren in der vorliegenden Studie *est II* (Stb) positiv. Handl *et al.* (1992) zeigten, dass 93 % der ETEC-Stämme durchfallkranker Absetzferkel in Schweden Stb positiv sind. Blanco *et al.* (1997) untersuchten 74 *E. coli* Isolate aus Ferkeln mit PWD oder der Ödemkrankheit. Dort zeigten über 78 % in der PCR ein Stb positives Ergebnis, gefolgt von Sta mit 62 %. Auch in unserer Untersuchung lag der Anteil der *est I* (StaP) positiven Isolate mit 26 % nur geringgradig unter dem von Stb, so dass den hitzestabilen Enterotoxinen bei dem Ausbruch von Ferkeldurchfällen nach dem Absetzen wohl eine größere Rolle zukommen dürfte. Osek (1999) fand allerdings bei 44 % von 372 Isolaten aus an PWD erkrankten Absetzferkeln ein LT I positives Ergebnis in der PCR. Die hitzestabilen Enterotoxine waren dort nur zu 9 % (STa) und 4 % (STb) vertreten. Eine frühere Studie (Osek und Svennerholm, 1991) ergab ebenfalls eine Dominanz von LT positiven Stämmen bei durchfallkranken abgesetzten und Saugferkeln. Der Anteil *elt-Ia* (LT I) positiver Isolate lag in unserer Studie bei 19 %, also deutlich unterhalb dem der beiden hitzestabilen Enterotoxine.

In der vorliegenden Studie war der größte Anteil *fae* (F4) positiver Isolate mit dem Gen für Stb assoziiert. Das entspricht Untersuchungen von Monckton (1988), während Osek (1999) F4 in erster Linie mit LT assoziiert fand. Er weist in seiner Studie außerdem darauf hin, dass eine Vielzahl der untersuchten *E. coli* Stämme ausschließlich Plasmide für die Enterotoxine ohne Assoziation zu Fimbrien aufweisen und vermutet, dass diese während der Lagerung verloren gegangen sein könnten. Blanco *et al.* (1997) berichten ebenfalls von dem Verlust von STa in phenotypischen und genotypischen Nachweisen. Auch in unserer Studie wiesen 23 % der Isolate ausschließlich Toxingene auf, wobei hier ein lagerungsbedingter Verlust aufgrund der der Entnahme unmittelbar folgenden Diagnostik ausgeschlossen werden kann. Die Pathogenität dieser Stämme erscheint fraglich, wenn nicht andere bisher noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. Andererseits wurden Fimbrien wie F41, F5 oder F6 in diese Untersuchung nicht miteinbezogen, so dass der tatsächliche Anteil fimbriennegativer Isolate möglicherweise niedriger anzusiedeln ist.

Die *E. coli* Isolate aus den Sauenfaeces zeigten hinsichtlich der Enterotoxine im Wesentlichen die gleiche Verteilung wie bei den Absetzferkeln. Auch hier waren die Gene der hitzestabilen Enterotoxine häufiger nachzuweisen als das des hitzelabilen Toxins. Auffällig erscheint das geringe Vorkommen von Fimbriengen. Nur ein Isolat war in der PCR *fae* (F4) positiv, während *fedA* (F18) nicht nachgewiesen wurde. Beide Anheftungs-faktoren sind bekannt, nur bei Jungtieren Durchfälle oder die Ödemkrankheit auszulösen. Bei adulten Tieren verschwinden die entsprechenden Stämme zunehmend, so dass hier die Nachweisbarkeit nicht mehr gegeben ist. Auch hier ist die Bedeutung der toxinpositiven Isolate ohne das Vorhandensein von Fimbrien fraglich.

Viele der hier untersuchten Faktoren wurden in früheren Studien in einer anderen Größenordnung und Verteilung beim Schwein nachgewiesen. Die Zahl der untersuchten Isolate schwankte sehr stark zwischen den Autoren, die Tiere waren in ganz unterschiedlichen geographischen Regionen heimisch, waren nicht immer aus einheitlichen Altersklassen und zeigten je nach Studie Krankheitssymptome oder nicht. Dies erschwert einen Vergleich der Ergebnisse erheblich. Ein nicht zu unterschätzender Faktor, der besonders in der molekularbiologischen Diagnostik eine große Rolle spielt, ist die Vergleichbarkeit der Methodik. Eine Veränderung der Sensitivitätsgrenzen um wenige Nanogramm DNA könnte bei unterschiedlichen Laboren durchaus zu anderen Ergebnissen führen.

### 5.3 Qualitativer Nachweis ausgesuchter *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren im Darm von Ferkeln nach Einsatz von *Bacillus cereus* var. *toyoi*

#### 5.3.1 Verteilung der *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren bei Ferkeln verschiedener Altersgruppen

Die Ferkel dieses Versuchs zeigten am 13. Lebenstag das hitzestabile Enterotoxin II (*est-II*) nur in geringem Maße. Erst mit dem 21. Lebenstag kam es zu einer Zunahme der positiven Proben. Die Kombination von *est-II* mit *fae* und *fas* kam hier nicht vor. *Est-II* konnte insbesondere in der Zeit vor dem Absetzen nur gemeinsam mit den anderen Enterotoxinen mit *fas* kombiniert vorgefunden werden. Dabei ist zu bedenken, dass hier keine Stämme isoliert wurden, sondern die Ergebnisse einen Querschnitt durch das Auftreten der untersuchten Pathogenitätsfaktoren in den Darmproben zeigen. So ist z.B. bei der Kombination *est-II/est-Ib/elt-Ia/fas* zunächst keine Aussage darüber möglich, ob ein *E. coli*-Stamm mit der Kombination *est-II/fas*, *est-Ib/fas* oder *elt-Ia/fas* ausgestattet ist.

In der frühen Alterstufe kam allerdings als einzige Kombination mit F6 *elt-Ia/fas* vor, so dass dieses Fimbrium in unserer Untersuchung während der Saugferkelperiode möglicherweise nicht mit *est-II* kombiniert war. Das Auftreten des hitzestabilen Enterotoxins II wird bezüglich des Alters in der Literatur widersprüchlich diskutiert. So wird es bei Ferkeln in der ersten Lebenswoche nur sporadisch aufgefunden (Beausoleil *et al.*, 1999). Andererseits werden häufiger Stämme isoliert, die Stb mit F4 und F6 kombiniert tragen (Beausoleil *et al.*, 1999). F6 ist ein Faktor, der insbesondere mit ETEC-Infektionen bei Neonaten einhergeht.

Bei insgesamt zwölf der 24 Ferkel, also 50 %, wurde *est-Ib* nachgewiesen. Wieler *et al.* isolierten aus Kotproben von insgesamt 228 an Diarrhoe erkrankten Ferkeln aus 24 Betrieben in Süddeutschland bei nur 10,1 % der Tiere *est-I* tragende Stämme (Wieler *et al.* 2001), Grundsätzlich können nach bisherigen Untersuchungen *E. coli*, die das hitzestabile Enterotoxin I tragen, bei allen Altersgruppen auftreten. In der vorliegenden Untersuchung zeigte es sich bis zum Absetzen nur in einem kleinen Teil der Proben. Der Schwerpunkt befand sich am 32. Lebenstag mit einer höheren Belastung in der

Versuchsgruppe. Es war vor allem am 32. Tag häufig mit *est-II* kombiniert, während bei den jüngeren Tieren oft jeweils nur ein Toxin auftrat. Die Wirkungsmechanismen der einzelnen Toxine am Enterozyten sind unterschiedlich, so dass sich bei einem kombinierten Auftreten ihre pathogenen Wirkungen möglicherweise summieren.

Das Gen des hitzelablen Enterotoxin I (*elt-Ia*) wurde in dieser Studie mit 21 Tieren (87,5 %) am häufigsten nachgewiesen, wobei die Kontrollgruppen aller Altersstufen die höchste Belastung zeigten. Die bereits oben angesprochene Untersuchung von Wieler *et al.* (2001) ergab eine Prävalenz *elt-Ia* tragender Stämme von 8,6 % der Tiere. Das hohe Vorkommen in unserer Untersuchung erstaunt, wenn man bedenkt, dass die von Wieler *et al.* untersuchten Ferkel eine Durchfallsymptomatik aufwiesen. Darüber hinaus war dort *est-I* häufiger vertreten als *elt-Ia*. Ein Erklärungsansatz wäre die Tatsache, dass in der hier vorliegenden Arbeit Mucosaprobe aller Darmabschnitte untersucht wurde, während sich die andere Studie auf Kotproben bezieht. So ist nicht auszuschließen, dass die erkrankten Ferkel bei der Untersuchung von Darmschleimhautproben eine höhere ETEC-Prävalenz aufweisen könnten. Zusätzlich kommt die Problematik der unterschiedlichen Regionen, in denen die Untersuchungen durchgeführt wurden, hinzu. Das Spektrum der beteiligten Stämme und deren Ausstattung mit enterotoxischen Faktoren könnten aus diesem Grund differieren.

Im Verlauf der Alterstufen konnten in unserer Studie wie erwartet keine Unterschiede festgestellt werden. *Elt-I* konnte in einer Vielzahl von Proben insbesondere in der Zeit vor dem Absetzen mit einem Schwerpunkt auf dem 13. Lebenstag als einziger Pathogenitätsfaktor dargestellt werden. Dies kann auf eine weite Verbreitung *elt-Ia*-tragender Stämme hinweisen, obwohl andere Studien am häufigsten StaP und Stb-tragende Stämme bei an Durchfall erkrankten Schweinen isolieren (Tab. 17). Da in der vorliegenden Studie zwar einzelne Tiere an Diarrhoe litten, aber eine Virus- oder Protozoengenerose nicht ausgeschlossen wurde, ist also unklar, ob sich in dieser Untersuchung ein *E. coli*-Stamm bis zum klinischen Bild manifestiert hat.

**Tabelle 17:** Literatúrauswahl zum Vorkommen von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren bei Ferkeln

Beschreibung (Anzahl)	F4	F6	F5	F41	StaP	Stb	LT	Stx2e	Land	Literatur
Durchfall nach 1–7d (191)	31	12	4	5	11	28	32	18	Dänemark	Ojeniyi <i>et al.</i> 1994
Durchfall (400)	4	6	2	3	10	8,5	4,3	-	Korea	Kwon <i>et al.</i> 1999
Durchfall/ Ödem (88)	10	32	12	9					Spanien	Garabal <i>et al.</i> 1997
Durchfall (74)					62	78	26	15	Spanien	Blanco <i>et al.</i> 1997
Durchfall, F4 - (70)	-				49		-	24	Ungarn	Nagy <i>et al.</i> 1990
ETEC Isolate (393)					52	74	31	-	USA	Moon <i>et al.</i> 1986
Durchfall (2271)	73	14			80			-	Polen	Osek, Truszczyński 1992
ETEC Isolate (135)					52	74	31	-	Schweden	Handl <i>et al.</i> 1992
Durchfall (103)	56				69		69	-	Polen	Osek <i>et al.</i> 1991
Durchfall (858)		56	5	6	100			-	Indonesien	Supar <i>et al.</i> 1991
Faeces (150)					71		37	-	Spanien	Celemin <i>et al.</i> 1995
Faeces (1080)	30	18	12	2	127			-	Mexico	Flores-Abuxapqui <i>et al.</i> 1997

Das Gen für das F5-Fimbrium fand sich bei allen drei Tieren der Kontrollgruppe des 32. Lebensstages in erster Linie in den Dickdarmabschnitten. Gleichzeitig konnte es bei den jüngeren Ferkeln nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist in dieser Form nicht ungewöhnlich, da erst ab der siebten Lebenswoche die Empfänglichkeit der Tiere hinsichtlich dieses Faktors rückläufig ist. Diese Altersresistenz beruht offenbar auf einer Konformationsänderung des spezifischen Rezeptors für F5 (Stamm und Sorg, 1993). Das Auftreten im Dickdarm könnte bei vornehmlich im Dünndarm siedelnden Bakterienarten darauf hinweisen, dass es sich um Passanten handelt. Der Nachweis von *fan* in der Mucosa ist nicht unbedingt dahingehend zu interpretieren, dass auch eine Anheftung der entsprechenden *E. coli*-Stämme stattgefunden hat. Das gilt natürlich für alle fimbriale Faktoren. Der Besatz mit spezifischen Rezeptoren beschränkt sich in erster Linie auf die Dünndarmabschnitte, wobei je nach Fimbrium regionale Unterschiede vorherrschen. So finden sich *E. coli*, die mit F5 ausgestattet sind, vornehmlich im distalen Jejunum und im Ileum (Bertschinger *et al.*, 1992). Durch die Behandlung der Darmproben zur Gewinnung

der Mucosa wurde zwar der größte Anteil luminaler Bakterien entfernt, tiefer im Schleimhautrelief sitzende Zellen aber womöglich nicht ausgewaschen.

Bei der Betrachtung der nachgewiesenen Pathogenitätsfaktoren wurde deutlich, dass die Tiere insbesondere vier Tage nach dem Absetzen wesentlich stärker belastet waren als in der Säugeperiode. Dabei nahm nicht nur die Anzahl der betroffenen Darmabschnitte, sondern auch die Anzahl der Faktoren pro Darmabschnitt zu, was einerseits darauf hinweisen kann, dass die Diversität der im Darm befindlichen pathogenen *E. coli*-Stämme in dieser Altersgruppe zunimmt. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass mit längerer Verweildauer im Tier die Übertragung der plasmidgebundenen Faktoren innerhalb der *E. coli*-Population vermehrt stattfindet. Diese Tendenz zeigte sich deutlicher in der Versuchsgruppe. Bei einem Ferkel wurden in fünf der untersuchten sieben Darmabschnitte das Gen für das Shiga-like Toxin 2e (*stx2e*) nachgewiesen. Lediglich die ersten zwei Anteile des Jejunums waren nicht betroffen. Bei diesem Tier konnte parallel dazu entlang des Darmtraktes das Gen für das F18-Fimbrium (*fedA*) nachgewiesen werden, dessen bevorzugte Assoziation zu Stx2e in der Literatur beschrieben wurde (Bosworth, 1996). Das Auftreten dieser Faktoren ist in der Regel auf die Zeit nach dem Absetzen beschränkt. In der Regel verursachen sie bei infizierten Tieren zehn Tage nach dem Absetzzeitpunkt das Bild der Ödemkrankheit. Ist F18 nicht mit Stx2e, sondern mit den hitzestabilen oder hitzelabilen Enterotoxinen assoziiert, kommt es anstelle der vasotoxischen Wirkung zum Bild der Diarrhoe. Diese Verhältnisse zeigten sich bei einem anderen Tier der Versuchsgruppe. Dort konnte *fedA* mit den Genen der beiden hitzestabilen Enterotoxinen kombiniert nachgewiesen werden. Es kommen aber auch Infektionen mit F18 tragenden *E. coli* vor, bei denen sich alle Toxinwirkungen zeigen und die Ferkel so neben der Bildung von generalisierten Ödemen zusätzlich Durchfall aufweisen. Bei beiden Tieren zeigte sich zum Zeitpunkt der Tötung vier Tage nach dem Absetzen keine Erkrankung, so dass nur vermutet werden kann, ob die vorliegenden Ergebnisse der Darmproben zu einem späteren Zeitpunkt tatsächlich zu einer Beeinträchtigung des Gesundheitsstatus geführt hätten. Hierzu wäre sicherlich die Untersuchung einer weiteren Altersgruppe interessant gewesen. Das Auffinden der genannten Faktoren im Dickdarm könnte allerdings darauf hinweisen, dass die entsprechenden Stämme zur Ausscheidung kommen, was wiederum für die Gesundheit des Bestandes relevant wäre. Dazu wäre eine zusätzliche Kotuntersuchung von größerer Aussagekraft.

Es ist bekannt, dass mit steigendem Alter der Tiere die Zahl löslicher F6-Rezeptoren im Darm zunimmt und so die Anheftung F6 tragender *E. coli* verhindert wird (Dean, 1990). Dieses Phänomen findet auch Ausdruck in den Ergebnissen dieser Studie, da sich das F6-Gen (*fas*) vom 13. Lebenstag bis zum Absetzen mit abnehmender Tendenz zeigte.

Das Gen für F41 (*fimf41a*) konnte in diesem Versuch bei keinem der Tiere nachgewiesen werden. Einerseits ist es möglich, dass die Menge an Zielsequenzen bei dem chromosomal codierten Faktor geringer ist als bei den plasmidcodierten Faktoren, von denen oft mehrere Kopien pro *E. coli*-Zelle vorliegen. Das Vorhandensein mehrerer Kopien eines Plasmides senkt die molekularbiologische Nachweisgrenze für den entsprechenden Faktor erheblich, während Zellen, die den nachzuweisenden Faktor als chromosomale Einzelkopie tragen in größerer Anzahl vorliegen müssen, um auswertbare Amplifikatmengen zu liefern. Andererseits ist *fimf41a* wegen seiner erschwerten horizontalen Übertragbarkeit nur mit einer sehr geringen Anzahl von *E. coli*-Serotypen assoziiert, die möglicherweise in einer so geringen Zellzahl im Ferkeldarm vorkommen, dass sie die Sensitivitätsgrenze von 1 fg Referenz-DNA unterschreiten. Hier wären sicherlich andere PCR-Systeme, z.B. die ‚Nested‘-PCR besser geeignet, auch geringste Mengen chromosomaler Zielsequenzen nachzuweisen.

### 5.3.2 Verteilung der *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren hinsichtlich der verschiedenen Fütterungsgruppen

Die Wirkung von Probiotika auf Enterobakterien, insbesondere *E. coli*, im Darm von Schweinen sind häufig untersucht worden. Dabei wurden mittels mikrobiologischer Methoden in erster Linie die Keimzahlen oder die Wachstumskapazitäten der im Darm befindlichen Bakterien bestimmt. Die Unterscheidung von pathogenen und nichtpathogenen *E. coli* ist dabei in der Regel nicht getroffen worden. Morgenthum *et al.* (1991) und Ahrens (1990) fanden eine drastische Reduktion von *E. coli* im Sauenkot nach Fütterung von *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Hattori und Watanabe (1981) zeigten einen signifikanten Rückgang von *E. coli* im Duodenalchymus von Absatzferkeln. Gedek *et al.* (1993) wiesen in der Prestarterphase des Versuches bei Saugferkeln im Dünndarm und im Kot eine Verringerung der *E. coli* Bakterien im Vergleich zur Kontrollgruppe nach. Der Gehalt in Caecum und Colon war allerdings vergleichsweise erhöht. Auch Thelen (1997) fand erhöhte *E. coli*-Keimzahlen im Caecum von 21 Tage alten Ferkeln. Eine Erhöhung

pathogener *E. coli* im Caecum bei Probiotikumzulage konnte in dieser Studie nur tendenziell nach dem Absetzen gezeigt werden. Verbesserungen bei der Durchfallhäufigkeit, der Schwere der Diarrhoe (Iben und Leibetseder, 1989) und der Kondition der erkrankten Ferkel (Ahrens, 1990) dienten als Nachweis der *E. coli*-regulierenden Wirkung von *Bacillus cereus* var. *toyoi*. De Cupere *et al.* (1992) infizierten Absetzferkel mit dem STEC-Stamm O141:K85 ab, konnte jedoch hinsichtlich der Mortalität, der klinischen Veränderungen im Sinne der Ödemkrankheit und des Durchfallgeschehens, sowie der faecalen Ausscheidung des Erregers keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

Da im Falle der fimbrienträgenden *E. coli* die Entfaltung der Erkrankung in jedem Fall über die Anheftung an Epithelzellen und die Aktivierung zellulärer Mechanismen ausgelöst wird, erscheint eine Untersuchung des mucosalen Anteils der *E. coli* im Darm aussagekräftiger zu sein als eine mikrobiologische Analyse des Chymus, die bestenfalls einen Überblick über das Vorhandensein der adhäsiven Enterobakterien geben kann. Die Beurteilung von Keimzahlen hinsichtlich eines Einflusses auf ein Durchfallgeschehen, bzw. die Verringerung derselben in einem gesunden Tier unter bereits physiologische Werte muß bei *E. coli* als klassisches Darmbakterium vorsichtig erfolgen.

In dem vorliegenden Versuch wurden jedoch auf genetischer Ebene Virulenzfaktoren pathogener *E. coli* bestimmt und eine Aussage über quantitative Veränderungen außer Acht gelassen. Es wurden allerdings an den gleichen Proben in unserem Institut Messungen der Wachstumsgeschwindigkeiten verschiedener Keimgruppen durchgeführt (Jadamus *et al.* 2000). Im Falle der Enterobakterien wurden alle erfaßt, die in einem Endo-Flüssigmedium ein Wachstum zeigten, das über eine photometrische Trübungsmessung bestimmt wurde.

Dort wiesen die Tiere der Versuchsgruppe am 13. Lebenstag deutlich niedrigere und gleichmäßigere Wachstumskapazitäten auf als die der Kontrollgruppe. Auch am 21. Lebenstag stiegen die Wachstumskapazitäten in der Kontrollgruppe entlang der Darmabschnitte weiter an und lagen ab dem zweiten Duodenalabschnitt deutlich über der Versuchsgruppe. Eine Umkehrung der Verhältnisse zeigte sich zum Zeitpunkt des Absetzens dahingehend, dass die Tiere der Versuchsgruppe zwar wie zuvor eine über alle Darmabschnitte hinweg ein gleichmäßiges Wachstum von Enterobakterien zeigten, diese aber über den Werten der Kontrollgruppe lagen. Am 32. Lebenstag wiesen beide Gruppen

ein erhöhtes Wachstum der Enterobakterien auf, wobei der Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen nur sehr gering ausfiel.

Die Analyse mittels MPCR ergab am 13. Lebenstag ebenfalls insgesamt ein geringes Vorkommen pathogener *E. coli* in den mucosalen Proben. Die Gruppen wichen dabei nur im Falle von *elt-Ia* (hitzeablabiles Enterotoxin I) tendenziell voneinander ab. In der Kontrollgruppe konnte im Gegensatz zur Versuchsgruppe Stx2e nachgewiesen werden, was in geringfügigem Umfang ein Ausdruck der Diversität und höheren Toxizität der vertretenden *E. coli*-Stämme sein kann. Am 21. Lebenstag nahm insgesamt die Belastung der Tiere mit pathogenen *E. coli* zu, wobei die Art der aufgetretenen Pathogenitätsfaktoren, also die Diversität bei beiden Gruppen gleich war. Dennoch zeigten sich hinsichtlich der Tierzahl und der Anzahl der positiven Proben in der Kontrollgruppe bei *est-II* (hitzeablabiles Enterotoxin II) und *elt-Ia* (hitzeablabiles Enterotoxin I) höhere Werte.

Zum Zeitpunkt des Absetzens am 28. Lebenstag erschien die Belastung mit pathogenen *E. coli* insgesamt niedriger als in der Altersgruppe zuvor. Während in der Versuchsgruppe nur *elt-Ia* in einem geringeren Probenumfang als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte, zeigte die Kontrollgruppe mit *est-II* und *fas* (F6) als zusätzlichen Faktoren tendenziell eine höhere Diversität. Am 32. Lebenstag, also vier Tage nach dem Absetzen nahm das Vorkommen pathogener *E. coli* insgesamt zu. Die Diversität der Pathogenitätsfaktoren lag in der Versuchsgruppe um einen Faktor höher.

Es scheint aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse bei der Bestimmung der Wachstumskapazitäten der Enterobakterien und des molekularbiologischen Nachweises der Pathogenitätsfaktoren aufgrund der Abweichungen am 28. Lebenstag und am 32. Lebenstag keine Korrelation vorzuliegen, was ursächlich damit zusammenhängen kann, dass bei der mikrobiologischen Methode alle Enterobakterien gemessen wurden, während das molekularbiologische Vorgehen ganz speziell auf pathogene *E. coli* abzielte. Ein Vergleich ist also nur möglich, indem das Auftreten der Pathogenitätsfaktoren zum Wachstumsverhalten der Gemeinschaft der Enterobakterien in Bezug gesetzt wird. So sind am 32. Lebenstag in der KBE-Messung die Unterschiede zwischen den Gruppen sehr gering, während in der PCR die Ausstattung mit Pathogenitätsfaktoren zwischen den Gruppen zum Teil differiert. Diesbezüglich scheint der Einfluss der Enterobakterien am Auftreten pathogener *E. coli* nicht besonders groß zu sein.

Tendenziell zeigt in der vorliegenden Untersuchung die Versuchsgruppe, insbesondere in den Altersstufen mit Beifuttergabe (21. und 28. Lebenstag), eine geringere Anzahl positiver Proben. Ein Trend, der sich durch alle Altersgruppen verfolgen lässt, ist das verminderte Auftreten *elt-Ia*-tragender *E. coli* in der Versuchsgruppe. Erst im Alter von 32 Tagen scheint die Anzahl an Pathogenitätsfaktoren in der Versuchsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren zugenommen zu haben.

So stellt sich doch, obwohl in dieser Studie keine Aussage über Keimzahlen getroffen werden konnte, hinsichtlich des vermehrten Auftretens von *E. coli* Pathogenitätsfaktoren vier Tage nach dem Absetzen die Frage, warum die Tiere nicht an den klinischen Symptomen einer ETEC- oder in einem Fall einer STEC-Infektion leiden. Trotz tendenziell höherer Belastung der Tiere der Versuchsgruppe trat in diesem Altersabschnitt kein Durchfall auf. Möglicherweise wurde das klinische Stadium zu den Tötungszeitpunkten noch nicht erreicht. Es stellt sich dennoch die Frage, wie aussagekräftig der qualitative Nachweis der Pathogenitätsfaktoren hinsichtlich der klinischen Symptomatik ist. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass der Keimdruck in den Versuchsanlagen für eine Infektion nicht ausreichend war. Der sensitive Nachweis von Pathogenitätsfaktoren allein ist möglicherweise ebenso wenig ein Beweis für eine potentielle klinische Gefahr für das Wirtstier wie die Bestimmung der Zahl enterotoxigener *E. coli* im Chymus, solange diese nicht um einen Faktor erhöht sind, bei dem die Erkrankung klinisch manifest wird. So wären Untersuchungen, die die Expression der ermittelten Pathogenitätsfaktoren mit berücksichtigen, zur Beurteilung der infektionsbiologischen Lage der Tiere sicherlich vorteilhafter. Andererseits besteht aber die Möglichkeit, dass subklinische Dosen pathogener *E. coli* im Darm die spezifische Immunabwehr anregen. Unter diesem Gesichtspunkt wäre das Auffinden einer großen Diversität von Pathogenitätsfaktoren ohne das Erreichen klinisch relevanter Keimzahlen eine zusätzliche immunogene Stimulation für das Tier im Sinne einer oralen Vakzinierung. So ergibt sich die Überlegung, ob *Bacillus cereus* var. *toyoi* auf anderem Wege als der selektiven Hemmung pathogener *E. coli* die Erkrankung unterbindet, die Antigenstimulanz, die insbesondere bei fimbrientragenden *E. coli* sehr spezifisch ist, dem Tier aber ‚zur Verfügung‘ steht.

Breves *et al.* (1997) zeigten in einem Versuch mit isolierten Epithelien des mittleren Jejunums von wachsenden Schweinen eine tendenziell verringerte Ansprechbarkeit des

Theophyllin-induzierten zellulären Kurzschlußstroms. Bei der Bestimmung der Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Fluxraten gab es allerdings keinen Hinweis auf eine Hemmung der transepithelialen Sekretion bei Probiotikum-Zulage. Theophyllin vermittelt seine sekretorische Wirkung ähnlich der *E. coli*-Enterotoxine über ein System zyklischer Nukleotide. Allerdings weisen erniedrigte Mannitolfuxraten auf eine erhöhte parazelluläre Dichtigkeit des Epithels hin. Dies könnte möglicherweise die Invasion von pathogenen *E. coli* in die Mucosa und die darauffolgende Vermehrung behindern. Thelen (1997) interpretierte einen Anstieg der Leukozyten, insbesondere der neutrophilen Granulozyten im Blut bei *Bacillus cereus* var. *toyoi*-Zulage als Anpassungsreaktion des Wirtes auf das körperfremde Bodenbakterium. Dieser Effekt wird im Darm durch ein frühes Auskeimen im vorderen Verdauungstrakt dahingehend unterstützt, dass eine Aktivierung des lymphatischen Gewebes bereits praecaecal erfolgt.

Van Briel (2002) zeigte, dass nach Einsatz von *Bacillus cereus* var. *toyoi* die IgA-Plasmazellen im Duodenum, sowie die  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in den Zotten des mittleren Jejunums signifikant erhöht waren und leitete daraus die Möglichkeit des verbesserten Schleimhautschutzes ab. Kosaka *et al.* (1998) fanden bei Mäusen nach *Bacillus subtilis*-Zulage eine signifikante Erhöhung der Aktivität von Makrophagen und NK-Zellen (natural killer cells), wobei die Aktivierung der Makrophagen schneller erfolgte. Bereits einen Tag nach der Probiotikumgabe kam es zur Erhöhung von Interferonen im Blut, woraus geschlossen wurde, dass diese die Aktivierung der Immunzellen auslösen.

Aber auch Untersuchungen bezüglich anderer Probiotika zeigen signifikante Ergebnisse bezüglich eines immunstimulierenden Effekts. Wagner *et al.* (1997) erhielten beim Einsatz von vier verschiedenen Probiotika, Laktobazillen und Bifidobakterien, bei gnotobiotischen und zum Teil athymischen Mäusen, die mit *Candida albicans* infiziert wurden, eine unterschiedlich intensive Stimulation der zellulären und humoralen Immunantwort. *L. acidophilus* und *Bifidobacterium animalis* verstärkten die Entzündungsreaktion im Sinne einer Erhöhung der polymorphkernigen Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten. *Bifidobacterium animalis* war in der Lage, in Kombination mit *Candida albicans* bei athymischen Mäusen die IgA-Produktion zu erhöhen. Bei Mäusen mit Thymus reichte das Bifidobakterium allein aus. Die Probiotika waren in der Lage, sowohl die *C. albicans*-Zahlen im Darm und die Schwere der Erkrankung zu verringern, als auch die Lebensdauer der Tiere zu erhöhen. Die Hemmung

des *C. albicans*-Wachstums korrelierte nicht immer mit dem Schutz vor orogastraler Candidiasis, was darauf hinweist, dass die Stimulation des Immunsystems des Wirtes vermutlich wichtiger ist als die bakterielle Inhibition des Pilzes im Darmtrakt. Dieses Ergebnis könnte ein Erklärungsansatz für das zum Teil vermehrte Auftreten von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren in der Versuchsgruppe des 32. Lebensstages sein.

Fukushima *et al.* (1998) zeigten eine signifikante Erhöhung von Immunglobulinen des Typs A im Stuhl von Kindern im Alter von 15 bis 31 Monaten, die eine Kombination unterschiedlicher Bifidobakterien erhielten. In dieser Studie konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Anti-Poliiovirus-IgA in den Faeces der zuvor geimpften Kinder nach Einnahme des Probiotikums beobachtet werden. Probiotika sind also in der Lage sowohl die zellvermittelte als auch die humorale Immunität zu verbessern. Im letzten Fall scheinen sie sogar als Adjuvans zu wirken.

Die Verbesserung zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen ist ein Faktor, der für niedrigere *E. coli*-Keimzahlen und einer Verbesserung des Krankheitsbildes bzw. der Verhinderung der klinischen Symptomatik bei Vorhandensein pathogener Stämme verantwortlich sein kann. Die Möglichkeit der Aktivierung spezifischer Abwehrmechanismen durch niedrige *E. coli*-Keimzahlen mit einer hohen Diversität der beteiligten Virulenzfaktoren wäre über die Stimulation unspezifischer Abwehrmechanismen hinaus eine mögliche Erklärung für die bessere Tiergesundheit in mit pathogenen *E. coli* belasteten Beständen bei Einsatz von *Bacillus cereus* var. *toyoi*. So führt prinzipiell die orale Antigenaufnahme durch die Aktivierung des mucosalen Immunsystems über die Vermittlung einer spezifischen humoralen Immunabwehr zu einer Erhöhung der sekretorischen IgA an den Schleimhäuten, nicht nur des Verdauungstraktes. Diesen Effekt macht man sich bei der oralen Vakzinierung dahingehend zunutze, dass beispielsweise spezifische Antikörper in der Milch eines oral vakzinierten Muttertieres dem Neugeborenen einen spezifischen Schutz gegen ein bestimmtes Antigen bieten. Das alleinige Verabreichen des Antigens reicht in der Regel für eine intensive Immunstimulation nicht aus. Aus diesem Grund werden Adjuvantien eingesetzt, denen bei großer chemischer Heterogenität die unterstützende Stimulation der Immunabwehr gemein ist (Ronco und Guy, 2000). Clements *et al.* zeigten 1988, dass das *E. coli* hitzelabile Enterotoxin bei oraler Verabreichung mit Ovalbumin (OVA) die mucosalen IgA im Vergleich zur alleinigen OVA-Gabe erhöht, den Serum-IgG-Spiegel sogar um das

30 bis 90fache. Dieser Effekt beruht offensichtlich auf die enzymatisch aktive A-Untereinheit des Toxins, da die B-Untereinheit allein keinen Einfluß zeigte. Niedrige Keimzahlen pathogener *E. coli* könnten nicht nur eine spezifische Immunantwort induzieren, sondern beinhalten im Falle des LT auch gleichzeitig ein verstärkendes Adjuvans.

### 5.3.3 Qualitativer Nachweis des *fae*-Gens in mucosalen DNA-Extrakten von Ferkeln nach Einsatz eines sporenbildenden Probiotikums

Auch bei der Untersuchung der mucosalen Proben auf das Vorhandensein von *fae* tragenden *E. coli* zeigte sich dass, die ersten beiden Altersgruppen nur sehr gering belastet waren. Erst zum Zeitpunkt des Absetzens waren in der Kontrollgruppe fünf vornehmlich im Dünndarm lokalisierte Proben *fae* positiv, während die Versuchsgruppe kein *fae* Vorkommen zeigte. Analog zu den Ergebnissen der MPCR wies erst am 32. Lebenstag die Versuchsgruppe tendenziell eine höhere *fae*-Belastung auf. Bei all diesen Ergebnissen ist zu beachten, dass unterschiedliche DNA-Mengen extrahiert worden sind und in einigen Fällen die Sensitivitätsgrenze unterschritten worden sein könnte. Dennoch können auch hier die Ergebnisse darauf hinweisend sein, dass bei Tieren mit Probiotikum-Zulage ein vermehrtes Vorkommen dieses Faktors nicht mit einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes gerechnet werden muss. Die Haltung der Versuchstiere entspricht im Sinne des hygienischen Standards jedoch nicht der Realität in den Aufzuchtbetrieben. Kyriakis *et al.* (1999) führten einen Fütterungsversuch mit an PWD erkrankten Absatzferkeln durch und fand in der probiotisch versorgten Versuchsgruppe eine Verringerung der Mortalität und der Ausscheidung F4 positiver *E. coli* über den Kot. Blomberg *et al.* (1993) zeigten, dass nicht nur *Lactobacillus fermentum* selbst die Adhäsion F4 tragender *E. coli*, ausgestattet mit den Subtypen K88ab und K88ac, an isolierter Ileummucosa hemmt, sondern auch der zellfreie *L. fermentum* Kulturüberstand. Dieses Phänomen war weitgehend pH-unabhängig. Es wurde daraus geschlossen, dass die F4-inhibierende Komponente kein Zellwandfragment oder eine organische Säure, sondern eine von *L. fermentum* in die Umgebung abgegebene Proteinkomponente ist. Der Anteil *fae*-positiver Proben an der Gesamtzahl der eingesetzten 168 mucosalen Proben ist in der vorliegenden Studie mit einer Zahl von 18 sehr gering. Auch die Untersuchung der Kotproben in den Stallanlagen (siehe 4.4.2) zeigte nur ein geringes Vorkommen *fae*

positiver Proben. In diesem Fall eignen sich die Bedingungen in den Versuchsanlagen möglicherweise nicht für eine Beurteilung dieses Pathogenitätsfaktors hinsichtlich eines möglichen Einflusses von *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Bei gesunden Tieren mit einem derartig geringen Durchseuchungsgrad mit *fae*-tragenden *E. coli* lassen sich offenbar keine Effekte erkennen, die auf eine Wirkung oder Nichtwirkung des Probiotikums schließen lassen.