

6 Zusammenfassung

Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (MPCR) zum Nachweis ausgewählter Virulenzfaktoren schweinepathogener *E. coli* - Einsatz bei Ferkeln mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* Zulage

In dieser Untersuchung wird die Validierung und Anwendung eines molekularbiologischen Nachweises von insgesamt neun Virulenzfaktoren schweinepathogener *E. coli* dargestellt. Dabei sollten die Gene für StaP (*est-Ib*), Stb (*est-II*), LT (*elt-Ia*), Stx2e (*stx2e*), F4 (*fae*), F5 (*fan*), F6 (*fas*), F18ab (*fedA*) und F41 (*fimf41a*) mittels einer Multiplex PCR (MPCR) und nachfolgender Hybridisierung mit internen Oligonukleotidsonden sowohl in *E. coli* Isolaten als auch in aus Darmmucosa von Ferkeln extrahierter DNA qualitativ nachgewiesen werden. Die Methode diente der Untersuchung von Darmproben eines an schwerer Diarrhoe erkrankten Absetzferkels, von Kotproben klinisch gesunder Ferkel und Sauen aus den institutseigenen Stallanlagen, sowie von Darmproben von Ferkeln nach Einsatz von *B. cereus* var. *toyoi* als probiotischen Futterzusatzstoff im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Die angewandte Methode zur simultanen DNA- und RNA-Gewinnung aus mucosalen Proben ermöglicht trotz der großen Anzahl an Arbeitsschritten und der damit verbunden Fehlerquellen die Extraktion einer zur Diagnostik ausreichenden Menge Nukleinsäuren aus gramnegativen Bakterien mit der zum Einsatz in der PCR notwendigen Qualität. Die MPCR wurde zunächst an der DNA von *E. coli* Isolaten validiert und im Laufe der Untersuchung bei mucosalen DNA-Extrakten eingesetzt. Sie stellte sich insbesondere beim Einsatz von Isolaten als schnelles und sensitives System zum genetischen Nachweis ausgewählter Virulenzfaktoren pathogener *E. coli* dar. Nachteilig ist jedoch die notwendige Optimierung, die ein hohes Maß an Zeitaufwand erfordert. Der Nachweis des Gens für F4 (*fae*) in den mucosalen DNA-Extrakten gelang mittels der MPCR jedoch nicht eindeutig. Eine PCR zum alleinigen Nachweis von *fae* konnte in relativ kurzer Zeit optimiert werden, wobei der Einsatz mucosaler DNA-Extrakte sporadisch zur Bildung unspezifischer Produkte führte. Bei der Hybridisierung mit mucosalen DNA-Extrakten nach der MPCR erwiesen sich acht der neun eingesetzten Oligonukleotidsonden als spezifisch und sensitiv. Die Sonde für *fae* lieferte nur bei Einsatz von DNA aus Isolaten

nach der MPCR spezifische Signale. Der sichere Einsatz bei den mucosalen DNA-Extrakten konnte nicht erreicht werden.

Sieben Tage nach dem Absetzen wurden Mucosaproben eines an Durchfall erkrankten Ferkels mittels MPCR untersucht. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine Kolonisierung des Ferkeldarms mit ETEC und STEC Stämmen. Bei in den Versuchsanlagen gesammelten Kotproben von Sauen und Ferkeln wiesen ein hoher Prozentsatz der gewonnen und mittels MPCR untersuchten Isolate *E. coli* Pathogenitätsfaktoren auf. Bei den Absetzferkeln fiel der Anteil der *fedA* positiven Isolate hoch aus. Zwei Isolate zeigten neben *fedA* auch das Vorhandensein von *stx2e* und *est-II*. Sie sind möglicherweise in der Lage, sowohl die Colidiarrhoe als auch die Ödemkrankheit auszulösen und könnten eventuell im Sinne eines Erregerreservoirs in Zusammenhang mit der Durchfallerkrankung des oben genannten Absetzferkels stehen. Zwanzig Prozent der Isolate reagierten in der PCR hinsichtlich *fae* mit einem positiven Ergebnis. *Est-II* war das am häufigsten mittels der PCR nachgewiesene Toxin und war besonders oft mit *fae* assoziiert.

In einem Fütterungsversuch erhielten Ferkel *B. cereus* var. *toyoi* als Futterzusatzstoff. Diese zeigten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe tendenziell, insbesondere aber in den Altersstufen nach erstmalig erfolgter Beifuttergabe (21. und 28. Lebenstag), eine geringere Anzahl Proben, in denen mittels MPCR *E. coli* Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen wurden. Ein Trend, der sich durch alle Altersgruppen verfolgen lässt, ist das verminderte Auftreten *elt-Ia* tragender *E. coli* in der Versuchsgruppe. Im Alter von 32 Tagen scheint die Anzahl an Pathogenitätsfaktoren in der Versuchsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren zugenommen zu haben. Bei keinem Tier dieser Altersstufe trat Durchfall auf. In Verbindung mit Ergebnissen anderer Studien, die bei *Bacillus cereus* var. *toyoi* Zulage auf eine signifikante zelluläre und humorale Immunstimulation hinweisen, könnte dieses Phänomen aus immunologischer Sicht möglicherweise als eine spezifische Antigenstimulanz des Immunsystems des Wirtstieres interpretiert werden. Darüber hinaus besteht unter Einbeziehung anderer Untersuchungen die Möglichkeit, dass über eine höhere Dichtigkeit der parazellulären Barriere im Darm eine begleitende Hemmung der Invasion pathogener *E. coli* in die Darmschleimhaut stattfindet und so das Krankheitsbild unterdrückt wird. Trotz der in der Literatur vielfach beschriebenen Senkung der *E. coli*-Keimzahlen im Darm von probiotisch versorgten Ferkeln wurde in

diesem Versuch keine nennenswerte Reduktion des Auftretens von Pathogenitätsfaktoren beobachtet.

7 Summary

Multiplex-polymerase-chain-reaction (MPCR) for demonstration of selected virulence factors from swine-pathogenic *E. coli* - Application to *B. cereus* var. *toyoi* supplemented piglets

In this investigation the validation and application of a molecular biological proof of a total of nine virulence factors of *E. coli*, which are pathogen for pigs, is shown. The genes for StaP (*est-Ib*), Stb (*est-II*), LT (*elt-Ia*), Stx2e (*stx2e*), F4 (*fae*), F5 (*fan*), F6 (*fas*), F18ab (*fedA*) and F41 (*fimf41a*) were qualitatively demonstrated using a multiplex PCR assay (MPCR) and subsequent hybridization with internal oligonucleotide probes for both, *E. coli* isolates and DNA which was extracted from piglet intestinal mucosa. This method was applied to the examination of intestinal specimens from a diarrhoeic piglet, and to faecal samples from healthy piglets and sows from the institute's stables, as well as intestinal specimens from piglets after using *B. cereus* var. *toyoi* as a probiotic feed additive in comparison with a control group.

In spite of the complicated working procedure and the involving sources of error, the applied method for simultaneous extraction of DNA and RNA from mucosa was successful in obtaining a diagnostically adequate amount of nucleic acids from gram negative bacteria with the required quality for PCR. Initially, the MPCR was validated using DNA from *E. coli* isolates and was then adopted to the examination of mucosal DNA extracts in the course of the study. It was a useful and sensitive method for the genetical detection of selected virulence factors of pathogenic *E. coli*, especially when using isolates. But the necessary intensive and time-consuming optimization seemed disadvantageous. In the mucosal DNA extracts, the detection of *fae* was not clearly successful. It was possible to optimise a specific PCR for *fae* in a short period of time, whereas using mucosal specimens sporadically led to the formation of unspecific products. Eight of the nine internal oligonucleotide probes proved to be specific and sensitive for hybridization of mucosal DNA extracts. The *fae* probe however only delivered specific signals for isolate-DNA subsequent to MPCR.

Specimens from the intestinal mucosa of a diarrhoeic piglet were examined by MPCR, seven days post weaning. The results indicated a contamination with ETEC and STEC strains. Of the faecal samples collected from piglets and sows at our test facilities, a high

percentage had positive MPCR results for *E. coli* virulence factors. The samples from the weaned piglets showed a high proportion of *fedA* positive isolates. Two isolates additionally carried the genes for *stx2e* and *est-II*. On the one hand, these might be able to initiate both, the post weaning diarrhea and the edema disease, and on the other hand could be associated to the diarrhoeic weaned piglet in terms of a reservoir for pathogens. Twenty percent of the isolates showed a *fae* positive reaction in MPCR. The most frequently detected enterotoxin gene was *est-II*, often associated with *fae*.

In a feeding trial piglets received *B. cereus* var. *toyoi* as a probiotic feed additive. Compared to a control group, these supplemented piglets had less samples with a positive MPCR results for *E. coli* virulence factors, especially on day 21 and 28 of life. In all age groups there was a tendency towards a decreased appearance of *elt-Ia* positive *E. coli* in the supplemented group. At the age of 32 days the number of pathogenicity factors seemed to have increased in the supplemented group compared to the controls. However, none of these animals showed signs of diarrhea. In context to results of other studies, which indicate a significant stimulation of the cellular and humoral immune system in correlation with *B. cereus* var. *toyoi* supplementation, this phenomenon could be immunologically interpreted as a specific antigen-induced stimulation of the host's immune system. Moreover, considering other investigations it is also possible that the invasion of the intestinal mucosa with *E. coli* is inhibited by an increased density of the paracellular barrier thus suppressing any clinical signs. In spite of the frequently described reduction of *E. coli* in the intestine of piglets supplemented with probiotics, no significant reduction of *E. coli* pathogenicity factors could be observed in this investigation.