# Plasmidfingerprints von Escherichia coli, isoliert von Rindermastitiden

Autor(en): **Baumgartner, A. / Nicolet, J. / Eggimann, M.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **125 (1983)**

PDF erstellt am: **30.04.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-592484

**Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

**Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

**http://www.e-periodica.ch**

Schweiz. Arch. Tierheilk. *125*, 491–496, 1983

Aus dem Veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Bern

# Plasmidfingerprints von *Escherichia coli*, isoliert von Rindermastitiden

von *A. Baumgartner*[1], *J. Nicolet und M. Eggimann*

## Einleitung

Als Erreger von Mastitis beim Rind wurden die heute als *E. coli* bezeichneten Bakterien 1886 von *Kitt* erstmals erwähnt. Durch *E. coli* ausgelöste Euterentzündungen sind meistens akut und von allgemeinen Symptomen begleitet. Es handelt sich um eine galaktogene Infektion, die besonders frisch laktierende Kühe betrifft.

Epidemiologisch betrachtet sind *E. coli*-Mastitis-Stämme heterogen. *Fey* [5] isolierte in einer Studie 85 Mastitis-Stämme, die sich auf insgesamt 36 verschiedene O-Serogruppen verteilten. Rund 50% der Stämme liessen sich 7 O-Gruppen zuordnen. *McDonald et al.* [4] ziehen aus ähnlichen Ergebnissen den Schluss, dass Mastitis-coli aufgrund einer solchen Heterogenität keine Epidemiestämme sein können. *Jasper et al.* [8] stellten fest, dass die Erreger der Colimastitis wahrscheinlich aus der Umgebung aufgenommen werden, im Gegensatz zu den Mastitis verursachenden *Streptokokken* und *Staphylokokken,* welche von Tier zu Tier weitergegeben werden.

Lange bestand die Auffassung, dass toxische *E. coli* auf hämatogenem oder lymphogenem Weg in das Euter gelangen können. *Fey* [6] bewies jedoch, dass bei Colimastitis nie eine Septikämie und nur selten geringe bakteriämische Schübe zu beobachten sind. Es ist deshalb anzunehmen, dass das Euter von aussen her mit *E. coli* infiziert wird.

Häufig finden sich bei medizinisch bedeutsamen Bakterien Antibiotikaresistenzen. In den meisten Fällen sind dafür R-Plasmide verantwortlich. Daneben werden weitere wichtige bakterielle Eigenschaften durch Plasmide kontrolliert. So Enterotoxin-, Hämolysin- und Colicinbildung, aber auch Stoffwechseleigenschaften. Von grosser Wichtigkeit sind auch plasmidkodierte Haftmechanismen von pathogenen Erregern. Plasmide können heute mit Schnellmethoden und ohne grossen apparativen Aufwand isoliert und im Agarosegel dargestellt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, Bakterienstämme aufgrund ihrer Plasmidzusammensetzung zu identifizieren. Dieses Verfahren wird «Plasmidfingerprinting» genannt [10].

Plasmide gleichen Molekulargewichtes sind nicht zwingend identisch. Mit Restriktionsendonucleasen lässt sich jedoch die Verwandtschaft von Plasmiden zeigen [1]. Die Anzahl Fragmente gleicher Grösse im Agarosegel ist ein Parameter für die

[1] Adresse: A. Baumgartner, Veterinär-bakteriologisches Institut, Länggassstrasse 122, CH-3012 Bern

Ähnlichkeit zweier Plasmide. Ziel dieser Arbeit ist es abzuklären, ob die Mastitiscoli, obschon serologisch heterogen, gemeinsame Plasmide aufweisen, die für die Pathogenese oder die Epidemiologie von Bedeutung sein könnten.

## Material und Methoden

*Bakterienstämme*

– Mastitiscoli wurden aus der Routinediagnostik in unserer Mastitisstation gesammelt. Nur Stämme mit eindeutiger Anamnese von akuter Mastitis wurden berücksichtigt. Ein erster Befund erfolgte aufgrund von klassischen kulturellen Merkmalen. Eindeutig als *E. coli* identifiziert wurden die isolierten Stämme bezüglich ihrer Reaktionen auf Laktose (+), Indol (+), Urea (−) und Zitrat (−). Für die Differenzierung von Problemkeimen kamen API 20-E-Teststreifen zur Anwendung.

– Die *E. coli*-Stämme mit den Referenzplasmiden RSF 2124, S-a und RP 4 stammen von *Dr. E. Lederberg,* Plasmid Reference Center, Stanford University. *E. coli* 921 Rif mit Plasmid pBR 322 stammt von *Prof. G. Lebek,* Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Universität Bern.

– In einem Landwirtschaftsbetrieb mit 11 Kühen wurde ein Mastitiscoli-Stamm mit Resistenz gegen Chloramphenicol, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Sulfonamid und Tetracyclin in Faeces nachgewiesen. Zur Vorselektion des gesuchten Keimes wurden 0,1 ml von 20% Kotsuspensionen auf Mc Conkey-Agar mit Chloramphenicol 50 µg/ml, Streptomycin 26 µg/ml und Tetracyclin 20 µg/ml ausgespatelt.

*Antibiogramme*

Antibiogramme wurden auf Müller-Hinton-Agar (Institut Pasteur) nach den Richtlinien des Institut Pasteur ausgeführt. Folgende Substanzen wurden geprüft: Ampicillin (Amp), Cefalotin (Ctn), Chloramphenicol (Cmp), Furazolidon (Fur), Gentamicin (Gen), Kanamycin (Kan), Neomycin (Neo), Polymyxin (Pol), Streptomycin (Str), Sulfonamid (Suf), Tetracyclin (Tet), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (Tsu).

*Isolation von Plasmid-DNA*

Plasmid-DNA wurde nach einer Methode von *Birnboim und Doly* [3] isoliert. Nach Lyse der *E. coli*-Zellen mit Lysozym folgt eine selektive alkalische Denaturierung. Plasmide bleiben doppelsträngig, chromosomale DNA bildet Einzelstränge. Nach Neutralisierung renaturiert das Bakterienchromosom zu einem unlöslichen Klumpen. Plasmid-DNA bleibt im Überstand und kann mit Aethanol bei − 20 °C präzipitiert werden.

*Restriktionsverdauungen*

Plasmid-DNA wurde mit Eco RI (Boehringer) nach Vorschrift der Firma Boehringer Mannheim verdaut. Vor der Verdauung wird die DNA zweimal mit Phenol extrahiert. Die Grössen der gebildeten Fragmente können mit Hilfe eines Längenstandards eruiert werden. Dabei handelt es sich um Hind III-verdaute DNA des Phagen $\lambda$ (Boehringer).

*Agarosegelelektrophorese*

0,8% Agarose (Sigma Typ II) wurde in Elektrophoresepuffer der Zusammensetzung 40 mM Tris, 20 mM Na-Azetat, 2 mM EDTA pH 7,8 gelöst. Nach 3-stündiger Laufzeit bei 8 V/cm (Elektrophoresesystem Biowerk) wurden die Gele mit Ethidiumbromid 1 µg/ml Elektrophoresepuffer während 20 Min. gefärbt und mit einer Polaroid-MP 4-Kamera unter UV-Einstrahlung bei 302 nm photographiert (Lampe C 63, Ultra Violet Inc., San Gabriel USA).

## Resultate

*Plasmidfingerprints von Mastitiscoli*

*Abbildung 1* zeigt die Plasmidfingerprints von 12 *E. coli*-Stämmen aus Fällen akuter, boviner Mastitis. Die Isolate stammen aus 12 verschiedenen Landwirtschaftsbetrieben und besitzen keine Antibiotikaresistenzen. 2 Stämme (Nr. 6 und 12) enthalten keine, die restlichen 10 nur sehr wenig und nicht identische Plasmide.

*Plasmidfingerprints von E. coli aus Rinderfaeces*

Es wird versucht, mit Plasmidfingerprints die Herkunft der Mastitiscoli aus Rinderfaeces zu zeigen. Zu diesem Zweck wurden in einem Kleinbetrieb mit 11 Kühen nach einem klinisch eindeutigen Fall akuter Colimastitis Kotproben entnommen. Der aus Milch isolierte Mastitiscoli konnte im Kot der erkrankten Kuh nachgewiesen

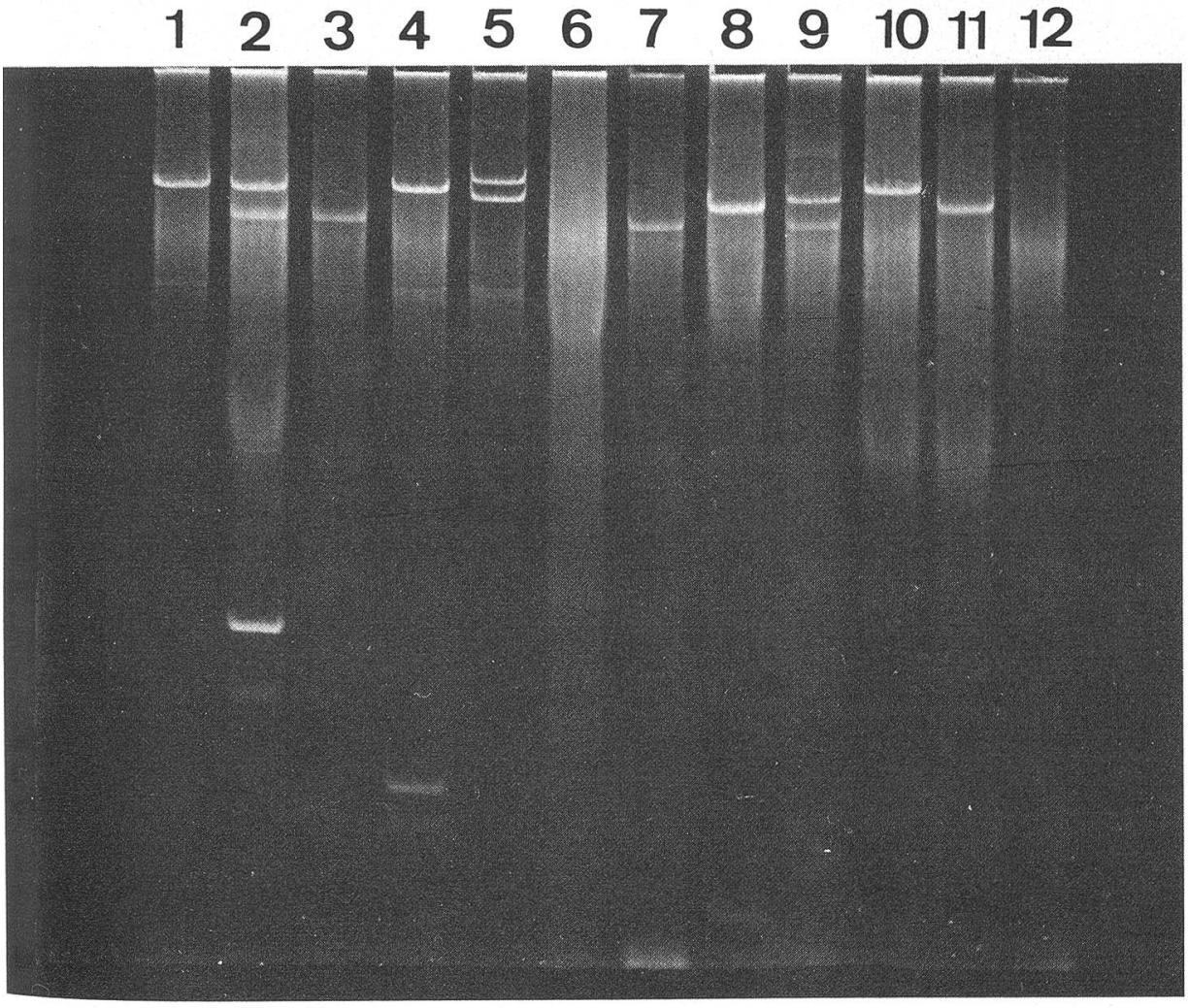


Abb. 1: Plasmidfingerprints von 12 *E. coli*-Stämmen ohne Antibiotikaresistenz aus 12 verschiedenen Landwirtschaftsbetrieben, isoliert nach Fällen akuter Mastitis.

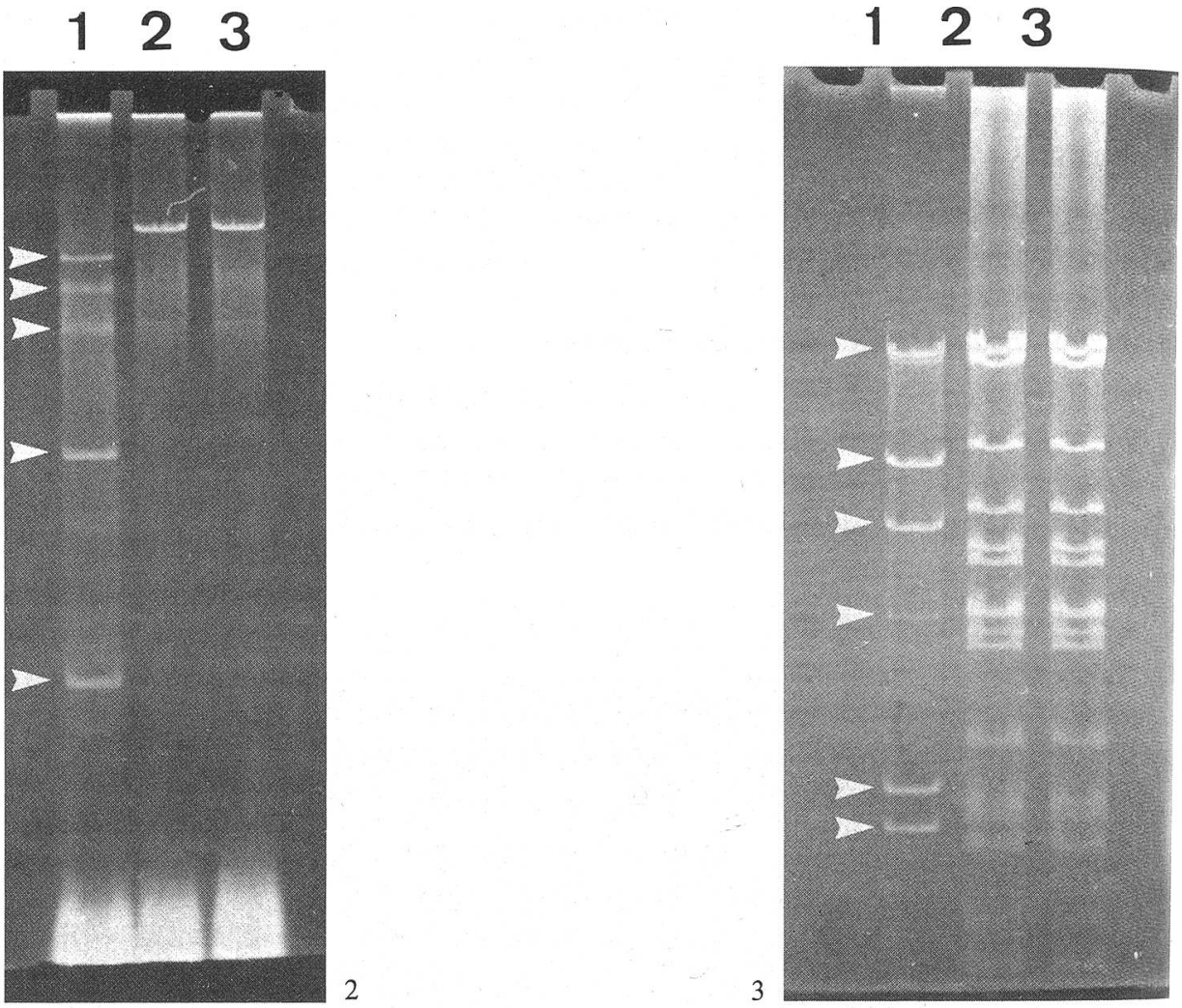


Abb. 2: Identifikation eines Mastitiscoli in Rinderfaeces mit Hilfe von Plasmidfingerprints.
1: Referenzplasmide: RP 4 = 34 Mdal, S-a = 25 Mdal, Chromosomale Fragmente, RSF 2124 = 7,4 Mdal, pBR 322 = 2,6 Mdal.
2: *E. coli,* isoliert aus Milch nach akuter Mastitis.
3: *E. coli,* isoliert aus den Faeces der erkrankten Kuh.

Abb. 3: Eco RI-Restriktionsverdauung eines 50 Mdal-Plasmides aus einem Mastitiscoli und einem *E. coli* aus Rinderfaeces.
1: Molekulargewichtsstandard (Phag $\lambda$ DNA Hind III verdaut) Fragmente: 15,88/6,36/4,38/2,86/1,49/1,31 Mdal.
2: Eco RI-Fragmente des 50 Mdal-Plasmides eines *E. coli,* isoliert aus Milch nach akuter Mastitis.
3: Eco RI-Fragmente des 50 Mdal-Plasmides eines *E. coli,* isoliert aus den Faeces der an Mastitis erkrankten Kuh.

werden. In den Faeces der restlichen 10 Kühe liess sich der entsprechende Stamm nicht auffinden. *Abbildung 2* vergleicht die Plasmidfingerprints der aus Milch und Kot isolierten Stämme. Beide Stämme enthalten ein einziges Plasmid mit dem ungefähren Molekulargewicht von 50 Megadalton (Mdal). Die aus Kot isolierten *E. coli*

haben nicht nur den gleichen Biotyp (API 20 E) wie der Mastitiscoli, sondern auch ein identisches Resistenzspektrum (Resistenzen: Cmp, Kan, Neo, Str, Suf, Tet).

*Abbildung 3* zeigt das Eco RI-Restriktionsmuster der 50 Mdal-Plasmide der *E. coli*-Stämme aus Milch und Faeces. Beide Plasmide weisen im 0,8%-Agarosegel nach der Verdauung 15 identische Fragmente auf. Eine Keimzahlbestimmung ergab, dass der Mastitiscoli nur einen kleinen Bruchteil der gesamten *E. coli*-Darmflora ausmacht. Auf $3{,}7 \times 10^6$ *E. coli*/g Kot finden sich $6{,}0 \times 10^2$ Mastitiscoli (0,016%).

## Diskussion

Plasmidfingerprints von Mastitiscoli verschiedener Herkunft zeigen keine Gemeinsamkeit. Dies bestätigt die mit serologischen Methoden beobachtete Heterogenität [4, 5]. Das zeitweilige Fehlen von Plasmiden, sowie das beobachtete uneinheitliche Plasmidbild, lassen auch die Existenz eines bei Mastitiscoli gemeinsamen und weit verbreiteten Virulenzplasmides ausschliessen. Ein vollständig anderes Bild ergeben zum Beispiel enteropathogene *E. coli* 0149:91:K 88 ac des Schweines. Das identische oder sehr ähnliche Plasmidbild zeigt eindrucksvoll die epidemische Natur dieser Stämme [2].

Aufgrund der Variabilität in Plasmidbild und Serologie ist anzunehmen, dass die Infektion des Euters mit fäkalen *E. coli* aus der näheren Umgebung erfolgt. In einem ausgewählten Fall gelang es uns mittels Plasmidfingerprint, einen bei akuter Mastitis isolierten *E. coli*-Stamm auch in den Faeces der erkrankten Kuh zu finden. Dieser Stamm stellte mit 0,016% nur einen kleinen Teil der gesamten Coliflora dar. Zur Identifikation des Mastitisstammes im Kot wurde die Biotypisierung, das Antibiogramm und der Plasmidfingerprint eingesetzt. Der aus Faeces isolierte Stamm hatte mit dem Mastitiscoli Biotyp, Resistenzbild sowie ein 50 Mdal-Plasmid gemeinsam. Dass die Plasmide in den beiden verglichenen Stämmen identisch sind, durfte aufgrund des gleichen Molekulargewichtes noch nicht ausgesagt werden. Erst die Restriktionsverdauung mit Eco RI bewies die tatsächliche Identität.

Es ist bekannt, dass R-Faktoren bei adulten Rindern relativ wenig verbreitet sind [7, 9]. Die Tatsache, dass Mastitiscoli im allgemeinen wenig Antibiotikaresistenzen zeigen (Daten nicht publiziert), ist ein weiteres Argument für die akzidentelle Infektion des Kuheuters durch *E. coli* der näheren Umgebung.

Aufgrund dieser epidemiologischen Überlegungen ist ein spezifisches Vorbeugen der Colimastitis nicht denkbar. Hingegen kann auf die hygienischen Verhältnisse und Mastitis fördernde Umwelteinflüsse besondere Aufmerksamkeit gerichtet werden.

**Zusammenfassung**

Mit Hilfe von Plasmidfingerprints liess sich zeigen, dass bei Mastitiscoli des Rindes ohne Antibiotikaresistenzen wenig und keine gemeinsamen Plasmide vorliegen. Dies im Gegensatz zu enteropathogenen *E. coli* 0149:91:K 88 ac des Schweines. Es ist gelungen, einen bei akuter Mastitis isolierten *E. coli*-Stamm auch im Kot der erkrankten Kuh nachzuweisen. Im Kot der restlichen 10 Kühe der Herde konnte der Stamm nicht gefunden werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass das Kuheuter durch Faecesspuren der näheren Umgebung infiziert wird.

**Résumé**

A l'aide des empreintes plasmidiques (plasmid fingerprints) on a pu montrer que, contrairement aux *E. coli* 0149:91:K 88 ac entéropathogènes du porc, il n'existe pas ou peu de plasmides communs pour des souches de *E. coli* responsables de mammites chez le bovin et ne présentant pas de résistance aux antibiotiques. Une souche de *E. coli,* isolée lors de mammite aigüe, a également pu être mise en évidence dans les excréments de la vache malade. Cette souche n'a pas pu être isolée dans les excréments des 10 autres vaches de l'exploitation. Ceci soutient l'hypothèse que la mammelle de la vache est infectée par des traces d'excréments provenant de son environnement le plus proche.

**Riassunto**

Per mezzo dei plasmid fingerprints si dimostra che nelle mastiti da *E. coli* del bovino nessuno o pochi plasmidi comuni sono presenti. Il contrario si verifica nel caso del ceppo enteropatogeno *E. coli* 0149:91:K 88 ac del suino. E stato possibile, in un caso di mastite acuta, isolare il ceppo di *E. coli* responsabile dell'affezione mammaria anche nelle feci della vacca malata. Nel caso dei rimanenti 10 animali il ceppo batterico non è stato isolato dalle feci. Questo reperto conferma il sospetto che la mammella del bovino può venire infettata da tracce di feci dell'ambiente circostante.

**Summary**

With the aid of plasmid fingerprints it could be shown that *E. coli* from bovine mastitis without antibiotic resistance harbour few plasmids, and none in common. This is in contrast to the enteropathogenic *E. coli* 0149:91 K 88 ac in pigs. It has been possible to prove that the *E. coli* strain isolated in an acute mastitis was also present in the faeces of the cow. But the strain could not be found in the faeces of the other 10 cows in the same herd. This gives weight to the supposition that the cow's udder is infected by traces of faeces in the immediate proximity.

**Literatur**

[1] *Arber W.:* Das Bakterium *E. coli* unter der Lupe der Molekulargenetiker. Mannheimer Forum 81/82 (1982). – [2] *Baumgartner A., Nicolet J. und Braun R.:* Plasmidfingerprints von schweinepathogenen *E. coli* 0149:91:K 88 ac: Charakterisierung eines Plasmides für Streptomycin- und Sulfonamidresistenz. Zbl. Vet. Med. B (im Druck). – [3] *Birnboim H. C. and Doly J.:* A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. *7,* 1513–1523 (1979). – [4] *McDonald T. J., McDonald J. S. and Rose B. S.:* Aerobic Gram-negative rods isolated from bovine udder infections. Amer. J. Vet. Res. *31,* 1937–1941 (1970). – [5] *Fey H.:* Serologische, biochemische und biologische Untersuchungen an Stämmen aus boviner Colimastitis mit spezieller Berücksichtigung der Coli-Säuglingsenteritis. Erg. Hyg. Bakt. *29,* 394–474 (1955). – [6] *Fey H.:* Zum klinischen Begriff der «septischen» coliformen Mastitis. Schweiz. Z. Path. Bakt. *21,* 926–934 (1958). – [7] *Jäggi S. und Jäggi M.:* Faeces-Untersuchungen bei Nutztieren nach siebenjähriger zuverlässiger Abstinenz von nutritiver Verwendung therapeutisch genutzter Antibiotika auf den Gehalt von R-Faktoren. Diss. dent. med. Bern (1980). – [8] *Jasper D. E., Dellinger J. D. and Bushnell R. B.:* Herd studies on coliform mastitis. J. Amer. Vet. Med. Ass. *166,* 778–780 (1975). – [9] *Lebek G. und Gubelmann P.:* Sechs Jahre gesetzlich angeordnete Abstinenz von therapeutisch genutzten Antibiotika als nutritive Futterzusätze in der Schweiz – Tierfaeces – Stichproben in einigen landwirtschaftlichen Betrieben. Schweiz. Arch. Tierheilk. *121,* 295–309 (1979). – [10] *Schaberg D. R., Tompkins L. S. and Falkow S.:* Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint Gram-negative bacilli. J. Clin. Microbiol. *13,* 1105–1108 (1981).

**Dank**

Wir danken dem schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die finanzielle Unterstützung (Projekt Nr. 3.958.0.80).

Manuskripteingang: 17. März 1983