

Nachweis von toxingenen verschiedener E. Coli pathotypen beim Schwein mit nichtradioaktiv markierten Sonden

Autor(en): **Boss, P. / Monckton, P. / Nicolet, J.**

Objektyp: **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): **134 (1992)**

Heft 1

PDF erstellt am: **21.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-589177>

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.

NACHWEIS VON TOXINGENEN VERSCHIEDENER *E. COLI* PATHOTYPEN BEIM SCHWEIN MIT NICHTRADIOAKTIV MARKIERTEN SONDEN

P. BOSS, R. P. MONCKTON, J. NICOLET, A. P. BURNENS

ZUSAMMENFASSUNG

Wir testeten hämolysierende *E. coli* von 86 Schweinen mit Colidiarrhoe oder Ödemkrankheit. Die *E. coli* wurden serologisch und mit nichtradioaktiv Digoxigenin-dUTP markierten Gensonden auf Toxingene der ETEC und VTEC untersucht. Mittels Objektträgeragglutination konnten in 38 Fällen *E. coli* O149:K88, in 28 Fällen *E. coli* O139:82B und in 20 Fällen *E. coli* O141 nachgewiesen werden.

E. coli der Serogruppe O149:K88, alle bei Colidiarrhoe isoliert, wiesen Gene der Toxine LT und ST_b auf. Die bei Ödemkrankheit isolierten *E. coli* O139:82B reagierten alle mit der Gensonde für SLT_{II}. Die *E. coli* O141, bei Colidiarrhoe oder Ödemkrankheit isoliert, wiesen ein vielfältiges Toxingenmuster auf. Alle *E. coli* O141-Isolate von diarrhoischen Schweinen wiesen nebst SLT_{II} auch Gene von LT oder ST_{ap} auf. Bei keinem der *E. coli* O141 ödemkranker Schweine liess sich eines dieser Enterotoxin-Gene nachweisen.

Der Toxinnachweis mit Gensonden bestätigte den Wert der Objektträgeragglutination als zuverlässige Methode für die Diagnostik bei *E. coli* O149:K88 und O139:82B. Im Falle von *E. coli* O141 liessen sich die pathologisch-anatomisch klaren Krankheitsbilder durch Unterschiede im Toxingenmuster erklären.

SCHLÜSSELWÖRTER: *E. coli* – Toxin – Gensonden – nichtradioaktiv – Schwein

EINLEITUNG

Enterotoxische *E. coli* (ETEC) beim Schwein sind häufige Erreger von Colidiarrhoe in der neonatalen Phase und nach dem Absetzen. Zur Kolonisierung des Darmes besitzen sie Fimbrien K88, 987P, K99 und F41 als Adhäsionsfaktoren (Smith und Linggood, 1971; Levine et al., 1983; Woodward und Wray, 1990). Die pathologische Wirkung der ETEC wird von grossmolekularen hitzelabilen (LT) und kleinemolekularen hitzestabilen Toxinen (ST) (Robertson et al., 1986; Gre-

DETECTION OF TOXIN GENES OF *E. COLI* PATHOTYPES ISOLATED FROM SWINE USING NONRADIOACTIVE PROBES

We tested hemolytic *E. coli* from 86 pigs with edema disease or colidiarrhea. They were tested serologically and with nonradioactive digoxigenin-dUTP labelled probes for the presence of enterotoxin or Shiga-like-toxin genes. By slide-agglutination we detected 38 cases with *E. coli* O149:K88, 28 with *E. coli* O139:82B and 20 with *E. coli* O141.

E. coli of serogroup O149:K88 isolated from diarrheic pigs, reacted with the probes for LT and ST_b genes. Edema disease *E. coli* O139:82B reacted with the SLT_{II} probe. *E. coli* O141, isolated from colidiarrhea or edema disease showed a diversity of toxin gene patterns. All the *E. coli* O141 from diarrheic pigs reacted with the probes for LT and ST_{ap} in addition to SLT_{II}. No strains isolated from pigs with edema disease possessed any of these enterotoxin genes.

Gene probe technique confirmed the serological method as useful tool for diagnosing *E. coli* O149:K88 and O139:82B as ETEC or VTEC, respectively. On the other hand only the demonstration of toxin genes with probes could explain the pathological findings in the pigs shedding *E. coli* of serogroup O141.

KEY WORDS: *E. coli* — toxin — probes — nonradioactive — pig

enberg und Guerrant, 1986) erzeugt. LT führen bei Darmepithelzellen über Aktivierung von zyklischem Adeninmonophosphat (cAMP) zu Sekretion von Natrium-, Kalium- und Bikarbonationen ins Darmlumen mit nachfolgendem Wassereinstrom. Bei ST-Toxinen können ST_{ap} und ST_b beim Schwein und ST_{ah} beim Menschen unterschieden werden (Greenberg und Guerrant, 1986). ST_{ap} aktiviert die Bildung von zyklischem Guanidinmonophosphat (cGMP) in Darmepithelien, was die Absorption von Chloridionen aus dem Darm hemmt und damit zu einer Nettosekretion führt. Der Wirkungsme-

Kästchen 1: Gebräuchliche Synonyme für hitzestabile *E. coli* Enterotoxine

| in dieser Arbeit verwendeter Ausdruck: | Synonyme: | Vorkommen: |
|--|------------------------------------|-----------------|
| ST _{ap} | ST _{Ia} , ST _p | Tier, Mensch |
| ST _{ah} | ST _{Ib} , ST _h | Mensch, Tier(?) |
| ST _b | ST _{II} , ST ₂ | Schwein |

chanismus von ST_b ist bisher unbekannt (Greenberg und Guerrant, 1986).

Ödemkrankheit oder Colienterotoxämie wird verursacht durch verotoxigene *E. coli* (VTEC). Die Bezeichnung Verotoxin wurde gewählt, weil die Toxine dieser *E. coli* mit der Vero-Zelllinie nachgewiesen werden. Als Adhäsionsfaktoren zur Kolonisierung des Darmes besitzen wenigstens ein Teil der VTEC Fimbrien 107 (Bertschinger et al. 1988). Das Verotoxin der VTEC von Schweinen wird auch Shiga-Like-Toxin II variant (SLT_{IV}) genannt (Weinstein et al., 1988). Shiga-Like-Toxine sind eine Gruppe von Toxinen, welche mit dem Toxin von *Shigella dysenteriae* eng verwandt sind. SLT hemmen die Proteinsynthese betroffener Zellen (O'Brien und Holmes, 1987).

Die Toxinproduktion bei *E. coli* (ETEC und VTEC) ist stark assoziiert mit dem Vorhandensein von Adhäsionsfaktoren bzw. bestimmten Serogruppen. Bei ETEC des Schweines sind Fimbrien K88 und Serogruppen O8, O147 und O149, bei VTEC die Serogruppen O138, O139 und O141 vorherrschend (Wilson, 1986; O'Brien und Holmes, 1987). In der Schweiz werden fast ausschliesslich ETEC der Serogruppe O149:K88 und VTEC der Serogruppen O139 und O141 isoliert. Die Diagnose bei Colidiarrhoe und Ödemkrankheit kann durch Nachweis dieser Antigene mittels Objektträgeragglutination rasch und effizient gestellt werden. Die Korrelation zwischen serologischen Markern und Toxinproduktion ist für *E. coli* nicht immer vollkommen. Antiseren für die Diagnostik toxinproduzierender *E. coli* sind zudem für andere Enterobacteriaceae, welche dieselben Toxine produzieren können, nicht anwendbar. Für die Erfassung solcher Fälle und von Stämmen, welche mehrere Virulenzfaktoren aufweisen, ist ein direkter Nachweis der Toxine wünschbar, und verschiedene Verfahren wurden dafür entwickelt. Toxine lassen sich immunologisch, im Tierversuch und mit Zellkulturen nachweisen (Riley, 1988; Robertson et al., 1986; Greenberg und Guerrant, 1986; Weinstein et al., 1988). Heute werden vermehrt Sonden zum Toxingennachweis anstelle dieser teilwei-

se aufwendigen, oft schwer interpretierbaren Toxinnachweisverfahren eingesetzt.

Mit Sonden für den Nachweis der DNA-Sequenzen von LT (Dallas et al., 1979), ST_{ap} (Sommerfelt et al., 1988), ST_b (Lee et al., 1983), SLT_I und SLT_{II} (Newland und Neill, 1988) können die Gene aller bekannten Toxine von ETEC und VTEC erfasst werden. Durch die starke Homologie der Gensequenzen erfasst die SLT_{II}-Sonde auch SLT_{IV}-Gene (Weinstein et al., 1988). Die Gensondentechnik erlaubt eine Untersuchung vieler Kolonien unabhängig von Bakterienspezies, Serogruppen, Adhäsionsfaktoren oder Toxinen. Das Ziel dieser Studie war die Anwendung von Gensonden zum Nachweis von Toxingenen bei ETEC und VTEC. Im Gegensatz zu früheren Studien (Bohnert et al., 1988; Woodward und Wray, 1990) wurde eine nicht-radioaktive Digoxigenin-dUTP Markierung (Riley und Caffrey, 1990) verwendet. Mit dem Zweck, diese gentechnologische Diagnostikmethode als Instrument für epidemiologische Abklärungen einzuführen, wurde ein Modell pathologisch klar definierter Krankheitsbilder zur Anwendung gewählt. Hämolytische *E. coli* von Schweinen mit Colidiarrhoe oder Ödemkrankheit wurden mit den Sonden LT, ST_{ap}, ST_b, SLT_I und SLT_{II} getestet. Nebst Bestätigung der Zuverlässigkeit der Methode erhofften wir auch neue Informationen über die toxischen Eigenschaften von *E. coli*-Stämmen in unserem Land zu gewinnen.

MATERIAL UND METHODEN

Bakterienisolation

Material aus Dünn- und Dickdarm von 86 Schweinen mit Colidiarrhoe oder Ödemkrankheit (Institut für Tierpathologie in Bern) wurde auf Schafblutagar und BROLAC-Agar kultiviert. Lactosefermentierende, hämolytische *E. coli* wurden mit Kaninchenserum gegen die Antigene K88, O138, O139, O141 und O149 auf Objektträgern agglutiniert. Pro Fall wurden 5 Einzelkolonien getestet.

Plasmide für Gensonden und Kontrollstämme

In Tabelle 1 sind Bezugsquellen und Plasmidbezeichnungen zusammengefasst.

Präparation der DIG-dUTP-markierten Sonden-DNA

Die Plasmide wurden nach Birnboim und Doly (1979) extrahiert. Nach Restriktionsverdauung und elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel wurden die DNA-Sonden mittels DEAE-Filter-Technik (Maniatis et al., 1989) isoliert. Die Sonde für SLT_I, ein Fragment von 1.14Kb, wurde mit BamHI aus pJN 37-19, die Sonde für SLT_{II}, 0.84Kb, mit PstI aus pNN

NACHWEIS VON TOXINGENEN MIT NICHTRADIOAKTIVEN SONDEN

Tab. 1: Plasmide und Kontrollstämme

| Plasmide für Gensonden | | |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| Plasmid | Sonde | Referenz |
| pJN 37-19 | SLT _I | Newland, Neill (1988) |
| pNN 111-19 | SLT _{II} | Newland, Neill (1988) |
| pDAS 101 | ST _{ap} | Sommerfelt et al. (1988) |
| pCHL 6 | ST _b | Lee et al. (1983) |
| pEWD 299 | LT | Dallas et al. (1979) |
| Kontrollstämme | | |
| Stamm | Toxin | Herkunft |
| R 81-120 | LT | H. Link, Nestlé Research Centre, Vevey |
| CDC C984 | SLT _I | Dr. N. Strockbine, Centers for Disease Control, Atlanta |
| CDC 1271-84 | SLT _{II} | dito |
| CDC 6357 | SLT _{II} ; ST _b | dito |

111-19 herausgeschnitten. Die LT-Sonde, ein Fragment von 0.85Kb, liess sich mit *Hind*III aus pEWD299 isolieren. Für ST_b wurde von einem 900bp-*Hind*III-Fragment aus pCHL 6 die Sonde von 430bp durch Verdauung mit *Alu*I und *Pst*I gewonnen. Die Sonde für ST_{ap}, 157bp, isolierten wir mit *Eco*RI und *Bam*HI aus pDAS101.

Die isolierten DNA-Fragmente wurden denaturiert und nach Anleitung des Herstellers (DNA Labeling and Detection Kit-nonradioactive, Katalog Nr. 1093 657, Boehringer Mannheim) 20 Stunden markiert.

Präparation der Filter zur Hybridisation

Die Filter aus Zellulosenmischester (Millipore HAWG 047 S3) wurden auf Luria Bertani Agar (*Maniatis* et al., 1989) mit bis zu 70 Einzelkolonien *E. coli* beimpft und 15 Std. bei 37 °C inkubiert.

Anschliessend wurde die bakterielle DNA extrahiert durch Auflegen der Filter auf Filterpapier (Whatman 3MM), mit NaOH 0.5M, NaCl 1.5M während 20 min, dann mit Tris-HCl 1M pH 7.5, NaCl 1.5M während 10 min, anschliessend mit Puffer A (Tris-HCl 50mM pH 8.0, NaCl 125mM, EDTA 10mM, SDS 0.5%) während 10 min, zuletzt mit Lysozym 5 mg/ml in Puffer A während 10 min. Nach UV-Fixation und einstündiger Behandlung mit Proteinase K 0.2 mg/ml in Puf-

Kästchen 2: Ablauf des Toxingennachweises

1. die zu untersuchenden Keime werden auf einem Nitrozellulosefilter angezüchtet
2. durch Auflösen der Bakterienzellen wird die Erbsubstanz (DNS) freigesetzt
3. Proteine werden enzymatisch entfernt, der DNS-Doppelstrang wird getrennt und die Einzelstränge der Bakterien-DNS werden auf dem Nitrozellulosefilter fixiert
4. ein DNS-Bruchstück des gesuchten Toxingens wird zugegeben. Das Bruchstück wurde vorgängig mit Digoxigenin markiert und einzelsträngig gemacht: dies ist die *Gensonde*.
5. Die Gensonde kann sich mit dem Einzelstrang des entsprechenden Gens, wenn es in der DNA der Keime auf der Nitrozellulose ebenfalls vorhanden ist, vereinigen
6. nicht gebundene Gensonde wird abgewaschen
7. gebundene Gensonde wird mit anti-Digoxigenin-Antikörpern aufgespürt und mit einer Farbreaktion nachgewiesen
8. Keime mit positiver Farbreaktion besitzen das gesuchte Toxingen.

fer A bei 50 °C wurden die Filter in Tris-HCl 50mM pH 7.6, NaCl 1M, EDTA 1mM, SDS 0.1% bei 50 °C 5 Std. vorgewaschen.

Getrocknet und lichtgeschützt liessen sich die so behandelten Filter mindestens 6 Monate konservieren, bevor sie hybridisiert wurden.

Hybridisation und Nachweis

Prähybridisieren und Hybridisation erfolgten nach Vorschrift Boehringer, die Stringenz, identisch für alle Sonden, betrug 1xSSC, 0.1%SDS bei 68 °C während zweimal 15 min. Im Durchschnitt nahm die Farbreaktion zwei Stunden in Anspruch. Als Kontrollen dienten Wildtypisolate von *E. coli* mit definiertem Toxingenmuster (Tab. 1).

Southern-Blot

Plasmide von *E. coli* O149:K88 wurden nach *Birnboim* und *Doly* (1979) extrahiert, mit *Eco*RI geschnitten und elektrophoretisch auf Agarose aufgetrennt. Die DNA wurde im Vakuum-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose transferiert und fixiert (*Maniatis* et al., 1989).

LT-Toxinnachweis

LT-Toxine wurden aus Wachstum von Blutagar nach Vorschrift immunologisch mit Phadebact^R ETEC-LT nachgewiesen.

RESULTATE

Wir isolierten hämolysierende *E. coli*, welche sich in 86 Fällen mit den Antiseren K88, O139 oder O141 agglutinieren liessen. Andere Serogruppen wurden nicht isoliert. Die fünf Kolonien *E. coli*, die pro Fall mit Gensonden getestet wurden, ergaben immer identische Resultate. Ergebnisse mit Gensonden bei Test- und Kontrollstämmen waren klar und eindeutig interpretierbar, wie Abbildung 1 zeigt. Bei 38 Fällen wurde der Adhäsionsfaktor K88 nachgewiesen. Die Isolate gehörten alle zur Serogruppe O149. Alle *E. coli* O149:K88 dieser Fälle reagierten mit den Gensonden für LT und ST_b (Tab. 2). In allen Fällen war LT auch immunologisch nachweisbar. Die *E. coli* O149:K88 wurden alle bei Schweinen mit Colidiarrhoe isoliert. Im Southern-Blot der Plasmide von zwölf *E. coli* O149:K88 (Abb. 2) verschiedenen regionalen Ursprungs waren klare Unterschiede im Bandenmuster nach Restriktionsverdauung mit *EcoRI* feststellbar.

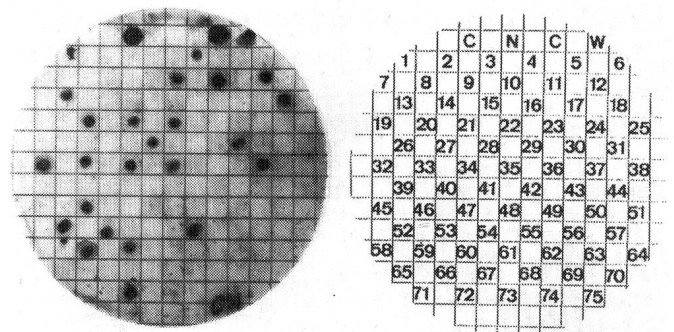
In 28 der Fälle von Ödemkrankheit wurden *E. coli* der Serogruppe O139 isoliert. Getestet mit Gensonden reagierten die *E. coli* aller 28 Fälle positiv mit der SLT_{II}-Sonde. Kein anderes Toxingen wurde nachgewiesen (Tab. 2). In 20 Fällen, teils bei Ödemkrankheit, teils bei Colidiarrhoe, liess sich bei den *E. coli* das O141-Antigen nachweisen. Sechzehn (80%) dieser *E. coli* reagierten mit der SLT_{II}-Sonde (Tab. 2). Zusätzlich war bei den *E. coli* von 8 Fällen (40%) das LT-, in 1 Fall (5%) das ST_{ap}- und in 13 Fällen (65%) das ST_b-Gen nachweisbar (Tab. 3). In den acht LT-positiven Fällen war LT auch immunologisch nachweisbar. In drei Fällen war bei keinem *E. coli* ein Toxingen nachweisbar.

Tab. 2: Übersicht über Toxingenmuster der hämolytischen *E. coli* bei 86 Schweinen

| Anzahl positive Reaktionen mit: | | | | | | |
|---------------------------------|----------|------------------|-------------------|----|-----------------|------------------|
| Serogruppe | Fälle(N) | SLT _I | SLT _{II} | LT | ST _b | ST _{ap} |
| O149:K88 | 38 | 0 | 0 | 38 | 38 | 0 |
| O139:82B | 28 | 0 | 28 | 0 | 0 | 0 |
| O141 | 20 | 0 | 17 | 8 | 13 | 1 |

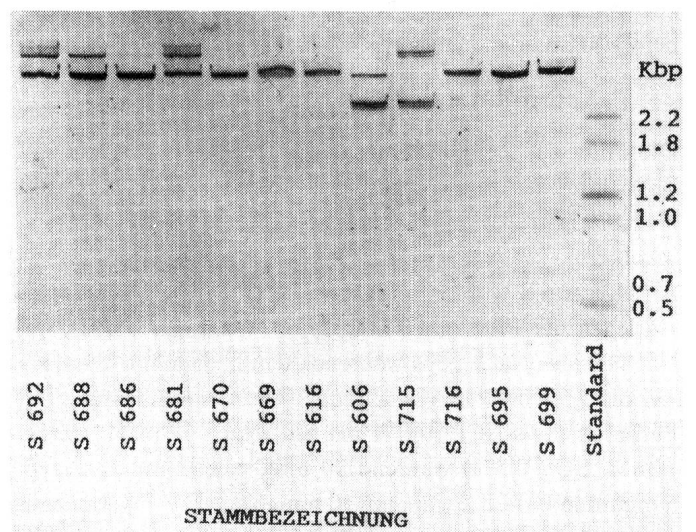
Keines der 9 Schweine mit SLT_{II}-positiven *E. coli* O141, bei welchen gleichzeitig LT- oder ST_{ap}-Gene gefunden wurden, wies Symptome von Ödemkrankheit auf. Pathologisch-anatomisch war in allen 9 Fällen Colidiarrhoe diagnostiziert worden. Bei den Schweinen mit SLT_{II}-positiven, LT/ST_{ap}-negativen *E. coli* wurde Ödemkrankheit diagnostiziert.

Abb. 1: Colony-Blot mit 75 *E. coli*-Isolaten, getestet mit SLT_{II}-Sonde, DIG-dUTP markiert



C: positive Kontrollstämmen mit Plasmid mit hoher Kopienanzahl
 W: positive Kontroll-Wildtypisolate
 N: negativer Kontrollstamm
 SLT_{II}-Gen positive *E. coli*:
 1, 4, 10, 11, 12, 13, 18, 20, 21, 22, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 46, 52, 53, 55, 59, 60, 72

Abb. 2: Southern-Blot von Plasmiden aus 12 *E. coli* O149:K88 verschiedener Herkunft, mit nichtradioaktiv-markierter LT-Sonde getestet



NACHWEIS VON TOXINGENEN MIT NICHTRADIOAKTIVEN SONDEN

Von drei Fällen mit Isolaten ohne Toxingene lautete die Verdachtsdiagnose in zwei Fällen Ödemkrankheit, in einem Fall Colidiarrhoe.

Kein *E. coli*-Isolat der 86 Schweine besaß die DNA-Sequenz von SLT_I.

DISKUSSION

Nichtradioaktiv mit Digoxigenin dUTP markierte Gensonden wurden bisher beim Menschen für die Diagnostik von ETEC angewendet (Riley und Caffrey, 1990). In der vorliegenden Studie wurden nun erstmals Digoxigenin dUTP markierte Sonden für die Untersuchung toxinbildender *E. coli* beim Schwein verwendet. Dabei gelangten sowohl Sonden zum Nachweis von ETEC wie auch von VTEC zum Einsatz. Als Untersuchungsobjekt dienten hämolytische *E. coli*, weil in der Literatur gezeigt wurde, dass zwischen 92% und 100% (Gannon et al., 1988; Francis und Wilson, 1985) der ETEC oder VTEC Hämolysin-positiv sind. Wir fanden bei 86 Schweinen hämolytische *E. coli*, die zu bekannten ETEC oder VTEC Serogruppen gehörten. Beim Nachweis der Toxingene mit Sonden lieferte die Digoxigenin dUTP-Methode klare und gut interpretierbare Resultate.

Für die ETEC der Serogruppe O149:K88 erwies sich die Objektträgeragglutination als sehr geeignetes Verfahren für die bakteriologische Diagnostik von Colidiarrhoe. Sämtliche *E. coli* mit Adhäsionsfaktor K88, isoliert bei massiven Diarrhoen, reagierten mit den Gensonden von LT und ST_b. Diese Resultate stimmen mit der Literatur überein, wonach Adhäsionsfaktor und Toxin gemeinsam vorhanden sein müssen, um starke Diarrhoe zu erzeugen. *E. coli* mit Enterotoxin ohne Adhäsionsfaktor sind im Tierversuch wirkungslos, *E. coli* mit Adhäsionsfaktor ohne Enterotoxin erzeugen höchstens schwache Diarrhoen (Smith und Linggood, 1971). Die ETEC der Ferkel sind im Krankengut unseres Institutes bezüglich serologischer Marker (O149:K88) und Toxinmuster (LT⁺ ST_b⁺) eine homogene Gruppe, und wir fanden eine vollkommene Übereinstimmung zwischen Agglutination und Toxingennachweis. Trotz dieser Homogenität existieren aber bei den Plasmiden mit LT-Toxigen Unterschiede, welche eine weitere Unterscheidung bestimmter Stämme erlauben, wie der Southern-Blot (Abb. 2) zeigt.

Die *E. coli* O139:82B, isoliert bei Schweinen mit Ödemkrankheit, reagierten alle mit der SLT_{II}-Gensonde. Somit besteht eine gute Übereinstimmung mit der Literatur, wo das Toxin für die pathologischen Läsionen der Gewebe verantwortlich gemacht wird (McLeod und Gyles, 1990).

Ein weitaus variables Bild zeigte sich bei *E. coli* O141. Obschon *E. coli* der O-Gruppe 141 als Erreger von Ödem-

Tab. 3: Verteilungsmuster der Toxingene von *E. coli* der Serogruppe O141

| Pathologisch-anatomische Diagnose | Reaktion mit der Sonde für | | | | | Immunologischer Nachweis LT-Toxin |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|----|-----------------|------------------|-----------------------------------|
| | SLT _I | SLT _{II} | LT | ST _b | ST _{ap} | |
| Diarrhoe (7)* | - | + | + | + | - | + |
| Diarrhoe (1) | - | + | + | - | - | + |
| Diarrhoe (1) | - | + | - | + | + | - |
| Ödemkrankheit (5) | - | + | - | + | - | - |
| Ödemkrankheit (3) | - | + | - | - | - | - |
| Ödemkrankheit**(2) | - | - | - | - | - | - |
| Diarrhoe**(1) | - | - | - | - | - | - |

* Anzahl Fälle in Klammern

** Verdachtsdiagnose

krankheit gelten, beobachten wir immer wieder Fälle von Colidiarrhoe mit *E. coli* O141. Mit der Gensonde getestet wies diese Serogruppe eine Vielfalt von Toxingen-Mustern auf (Tab. 3). *E. coli* O141, welche bei Colidiarrhoe isoliert wurden, besaßen nebst dem SLT_{II}-Gen immer auch Enterotoxingene. Hingegen reagierte keiner der bei Ödemkrankheit isolierten Erreger mit der LT- oder ST_{ap}-Sonde. Das Gen eines weiteren ETEC-Toxins, ST_b, erschien bei verschiedenen Isolaten beider Krankheitsbilder. Das Toxin scheint in seiner Wirkung von untergeordneter Bedeutung, was auch die Schwierigkeit des Toxin nachweises im Tierversuch aufzuzeigen vermag (Whipp, 1990).

Was die Toxine SLT_{II} und LT/ST_{ap} bei dieser heterogenen Gruppe anbelangt, scheint bezüglich Dominanz der Wirkung ein klares Bild zu bestehen. *E. coli*, welche ein Toxin aufweisen, exprimieren in der Regel das Toxin (Vadivelu et al., 1987; Cryan, 1990). Bei allen LT-Gen-positiven *E. coli* in dieser Gruppe konnte denn auch wie erwartet Enterotoxin immunologisch nachgewiesen werden. Bei Isolaten, welche gleichzeitig Enterotoxine und Verotoxine exprimieren, scheinen also die Enterotoxine in ihrer Wirkung zu dominieren, denn das Krankheitsbild war in all diesen Fällen Colidiarrhoe. Das Vorkommen von SLT_I bei pathogenen *E. coli* beim Schwein wurde bisher nicht beobachtet, was sich mit unseren Ergebnissen deckt.

An einem Kollektiv pathogener *E. coli* getestet, erzielte die Methode sehr gute, mit der sonstigen Literatur übereinstimmende Ergebnisse. Ihre Stärke liegt darin, dass, ungeachtet des Serotyps oder der Bakterienart, der Nachweis von Toxingenen Auskunft über die potentielle Virulenz eines Erregers geben kann.

LITERATUR

Bertschinger H. U., Bachmann M., Mettler C., Pospischil A., Schraner E. M., Stamm M., Sydler T., Wild P. (1988): Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxemia in pigs. *Vet. Microbiol.* 25, 267–281. — Birnboim H. C., Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7, 1513–1523. — Bohnert M. G., d'Hauteville H. M., Sansonetti P. J. (1988): Detection of enteric pathotypes of *Escherichia coli* by hybridization using six DNA probes. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* 139, 189–202. — Cryan B. (1990): Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 28, 792–794. — Dallas W. S., Gill D. M., Falkow S. (1979): Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. *J. Bacteriol.* 139, 850–858. — Francis D. H., Wilson R. A. (1985): Concurrent infection of pigs with enterotoxigenic *Escherichia coli* of different serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 22, 457–458. — Gannon V. P. J., Gyles C. L., Friendship R. W. (1988): Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. *Can. J. Vet. Res.* 52, 331–337. — Greenberg R. N., Guerrant R. L. (1986): *E. coli* heat-stable enterotoxin, pp. 115–136. In: Dorner F. and Drews J. (eds.), *Pharmacology of bacterial toxins. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Section 119*, Pergamon Press, Oxford. — Lee C. H., Moseley S. L., Moon H. W., Whipp S. C., Gyles C. L., So M. (1983): Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect. Immun.* 42, 264–268. — Levine M. M., Kaper J. B., Black R. E., Clements M. L. (1983): New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47, 510–550. — MacLeod D. L., Gyles C. L. (1990): Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect. Immun.* 58, 1232–1239. — Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A. — Newland J. W., Neill R. J. (1988): DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1292–1297. — O'Brien A. D., Holmes R. H. (1987): Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51, 206–220. — Riley L. W. (1988): Infectious diseases associated with *Escherichia coli*. In: *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Principle and Practice*, edited by Balows A., Hausler W. J., Ohashi M. and Turano A., Springer Verlag, New York, U.S.A., pp. 237–261. — Riley L. K., Caffrey C. J. (1990): Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization with non-radioactive digoxigenin-labeled DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1465–1468. — Robertson D. C., McDonel J. L., Dorner F. (1986): *E. coli* heat-labile enterotoxin, pp. 77–114. In: Dorner F. and Drews J. (eds.), *Pharmacology of bacterial toxins. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics, Section 119*, Pergamon Press, Oxford. — Smith H. W., Linggood M. A. (1971): Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med.*

Microbiol. 4, 467–485. — Sommerfelt H., Henning Kalland K., Raj P., Moseley S. L., Bhan M. K., Bjorvatin B. (1988): Cloned polynucleotide and synthetic oligonucleotide probes used in colony hybridization are equally efficient in the identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2275–2278. — Vadivelu J., Dunn D. T., Feachem R. G., Drasar B. S., Fox N. P., Harrison T. J., Loyd B. J. (1987): Comparison of five assays for the heat-labile enterotoxin of *E. coli*. *J. Med. Microbiol.* 23, 221–226. — Weinstein D. L., Jackson M. P., Samuel J. E., Holmes R. K., O'Brien A. D. (1988): Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 170, 4223–4230. — Whipp S. C. (1990): Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect. Immun.* 58, 930–934. — Wilson M. R. (1986): Enteric colibacillosis, pp. 520–528. In: Leman A. D., Straw B., Glock R. D., Mengeling W. L., Penny R. H. C. and Scholl E. (eds.), *Diseases of Swine*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. — Woodward M. J., Wray C. (1990): Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in animals. *Vet. Microbiol.* 25, 55–65.

Mise en évidence de gènes de toxines de souches d'*E. coli* pathogènes isolée du porc

Nous avons étudié les souches d'*Escherichia coli* hémolytiques isolées chez 86 porcs souffrant de maladie de l'oedème ou de diarrhée colibacillaire. Ces souches ont été analysées sérologiquement ainsi qu'avec des sondes froides marquées à la digoxigénine afin de détecter la présence de gènes d'entérotoxines ou de vérotoxines. Par agglutination sur lame nous avons trouvé 38 cas d'infections dues aux *E. coli* O149:K88 et 28 cas avec *E. coli* O139:82B. Dans 20 cas des *E. coli* du sérotype O141 ont été isolés.

La totalité des *E. coli* du sérotype O149:K88 isolés dans les cas de diarrhée colibacillaire possédaient les gènes des entérotoxines LT et ST_b. Les *E. coli* O139:82B isolés dans les cas de la maladie de l'oedème réagissaient tous avec la sonde SLT_{II}. Nous avons pu démontrer la présence de *E. coli* O141 aussi bien dans des cas de la maladie de l'oedème que de diarrhée colibacillaire. La gamme des toxines produites par ces souches variait en fonction des images pathologiques observées. Tous les *E. coli* O141 isolés chez les porcs souffrant de diarrhée colibacillaire possédaient des gènes LT ou ST_{ap} en plus des gènes SLT_{II}. Aucun *E. coli* O141 portant des gènes d'entérotoxines autre que ST_b n'a pu être mis en évidence chez les porcelets atteints de maladie de l'oedème.

En conclusion nous avons constaté que le sérodiagnostic corrélait parfaitement avec la présence d'entérotoxines pour les *E. coli* O149:K88 voir de vérotoxines pour les *E. coli* O139:82B chez le porc. Les *E. coli* du sérotype O141 par contre sont capables de produire une gamme variable de

NACHWEIS VON TOXINGENEN MIT NICHTRADIOAKTIVEN SONDEN

toxines. La mise en évidence de ces toxines par la méthode des sondes froides permet d'expliquer les différences de l'image pathologique observée dans les cas d'infections intestinales par les colibacilles de ce sérotype.

Accertamento di geni responsabili per la produzione di tossine in diversi tipi di E. coli patogeni nel maiale, con sonde non radioattive

Abbiamo studiato degli E. coli emolitici di 86 maiali con diarrea o con la malattia dell'edema. Gli E. coli sono stati analizzati in base ai geni delle tossine ETEC e VTEC serologicamente e mediante sonde genetiche marcate con Digoxigenin-dUTP non radioattive. Mediante l'agglutinazione sul vetrino porta oggetti si sono accertati 38 casi di E. coli O149:K88, 28 casi di E. coli O139:82B e 20 casi di E. coli O141.

Gli E. coli del gruppo sierologico O149:K88, tutti isolati in casi di diarrea da E. coli, mostravano geni delle tossine LT e ST_b. Tutti gli E. coli O139:82B, isolati nella malattia dell'edema, reagirono con la sonda genetica SLT_{II}. Gli E. coli O141 isolati sia in casi di diarrea che di malattia dell'edema, mostravano diversi esemplari di geni responsabili per la produzione delle tossine. Tutti E. coli O141 isolati da maiali con diarrea, mostravano geni SLT_{II} come anche geni LT o ST_{ap}. In nessun caso di maiali affetti da malattia dell'edema da E. coli si è potuto isolare uno di questi geni, responsabili della produzione dell'enterotossina.

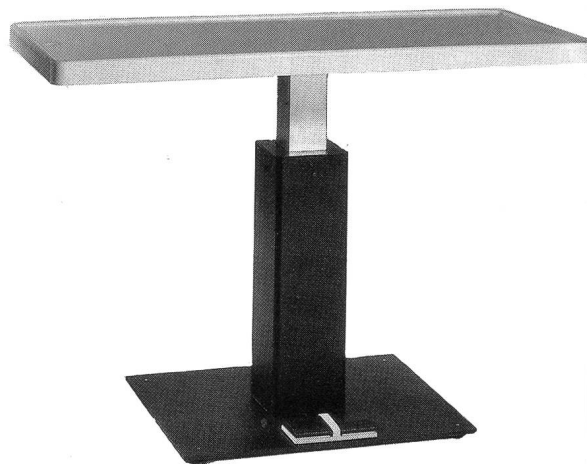
L'accertamento delle tossine mediante delle sonde genetiche conferma il risultato dell'agglutinazione sul vetrino porta-oggetti e si è dimostrato come metodo sicuro per la diagnosi di E. coli O149:K88 e O139:82B. Nel caso di E. coli O141 si spiegano chiaramente i risultati patologico-anatomici con le differenze negli esemplari genetici delle tossine.

Adresse: Dr. A. P. Burnens
Nationales Zentrum für
Lebensmittelvergiftungen
Länggass-Strasse 122
CH-3012 Bern

Manuskripteingang: 13. Dezember 1990

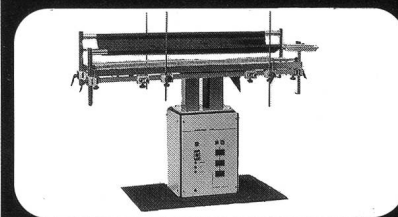
Die richtige Lage ist entscheidend

Der höhenverstellbare
Untersuchungstisch
von indulab sorgt für



ermüdungsfreies Arbeiten.
Mit elektrischem Antrieb
kann die richtige Höhe
rasch eingestellt werden.

Auf Wunsch auch Kippvor-
richtung und Tischplatte in
Formica, PVC oder rostfrei-
em Stahl erhältlich.
Standfest und wartungsfrei.



Der OP-Tisch für die Tierklinik. Elektro-
nische Höhen- und Neigungsverstellung.
Fernsteuerung. Hohe Zuverlässigkeit durch
modernste Technik.

Verlangen Sie eine ausführliche
Dokumentation bei:

indulab ag

Haagerstrasse
CH-9473 Gams

Tel. 085 / 7 14 14
FAX 085 / 7 15 10

indulab