


### Untersuchungen zur Differenzierung von E. coli-Isolaten auch im Hinblick auf ihre Verwendung in stallspezifischen Impfstoffen




Dr. H. Salisch, Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Geflügelgesundheitsdienst, Grub

7. Dresdner Kolloquium „Bestandsspezifische Impfstoffe für Geflügel, eine Standortbestimmung“

FLI Riems, TSK Sachsen u. LTK Sachsen  
Sitzungssaal der LTK Sachsen, Dresden, 06.06.2017

Gefördert aus Mitteln des Freistaates Bayern durch das Bayer. Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten sowie der Bayer. Tierseuchenkasse

### Das Projekt EcoDIFF des TGD-Bayern e.V.




- Ziel: Differenzierung von E. coli-Isolaten aus Legehennen und aus Masttieren (Hähnchen, Puten, Gänse, Enten)
- Für bayerische Landwirte über den GGD kostenfreie Teilnahme
- Isolierung von E. coli aus mitgenommenen Tieren\* (frisch tot, eingefroren, getötet) und Kloakentupfern
- allg. bakt. Untersuchung, MHK, Serotypisierung, MALDI-TOF und Isolat-Rückstellung von allen gefundenen Isolaten
- Auswertungen: Vorkommen von Serotypen, Möglichkeiten der Massenspektroskopie über die Speziesbestimmung hinaus, Status Antibiotika-Resistenzen

*\* überwiegend mit pathologischem Sektionsbild, aber auch in der Sektion unauffällige Tiere.*

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2016

### Isolierungsraten von E.coli in EcoDIFF ca. 3 (2015) oder 4 Proben (2016) je Betrieb und Besuch




| Proben untersucht 2015 | Proben pos. für E. coli | Isolierungs-erfolg (%) | Betriebe untersucht | Betriebe pos. für E. coli | Betriebe pos. für E. coli (%) |
|------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 149                    | 117                     | 78,5                   | 46                  | 40                        | 87,0                          |
| Proben untersucht 2016 | Proben pos. für E. coli | Isolierungs-erfolg (%) | Betriebe untersucht | Betriebe pos. für E. coli | Betriebe pos. für E. coli (%) |
| 256                    | 182                     | 71,1                   | 56                  | 49                        | 87,5                          |

E. coli finden ist nicht schwer (in 5 von 6 Betrieben bei nur einem Besuch), aber: Welche Isolate sind interessant, z.B. für einen stallsp. Impfstoff?

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2017

### Das Problem der E. coli-Serotypisierung



173 O-Antigene (Teil der LPS) in der Natur in allen  
80 K-Antigene (Polysaccharide) möglichen Kombinationen  
56 H-Antigene (Flagellin Protein) (50.000 bis 100.000)

der kleinere Teil davon ist Durchfallerkrankungen, z.B. EHEC  
ist pathogen: Extraintestinale Erkrankungen


Orskov u. Orskov (1992), Can. J. Microbiol. 38, 699-704

Wen in einen Impfstoff nehmen?

Bei einem Durchfallproblem sicherlich E. coli aus dem Darm erkrankter Tiere, bei einer Septikämie E. coli aus den Organen erkrankter Tiere, aber keine E. coli aus Kot oder Kloakentupfern gesunder Tiere.

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2016

### Serotypisierung von E. coli Korrelation von Virulenzfaktoren und O Gruppen?



96 E. coli von Patienten mit und ohne Urosepsis untersucht: 56 (=58%) der bakteriämischen Isolate gehörten zu den Serotypen O1, O2, O4, O6, O8, O9, O18 und O83)

Virulenzfaktoren besonders häufig bei den Serotypen O2, O4, O6, O18 und O83.


Nur 16 % der Isolate aus dem Kot gesunder Individuen waren virulent.

Blanco et al. (1994), Microbiologia 10 (3) 249-256.

Die Untersuchung auf O1,O2,O18 u. O78:K80 im Panel von Sifin für Geflügel macht weiterhin Sinn, kann aber nicht das einzige Entscheidungskriterium sein.

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2016

### Isolierungserfolge und Zuordnung zu Serotypen in EcoDIFF 2016



**Tabelle 3: Projekt NAK: ECO-DIFF Ergebnisse der Serotypisierungen und Erfolg der Erregerisolierungen bei 256 Proben**

| Serotyp Probenart (n)          | NON  | O1 | O2   | O18 | O78 | n.n. | Isolierungs-erfolg (%) |
|--------------------------------|------|----|------|-----|-----|------|------------------------|
| Tu-Kloake (93)                 | 59   | 0  | 5    | 5   | 1   | 23   | 75,3                   |
| Darm (1)                       | 1    | 0  | 0    | 0   | 0   | 0    | ( 100 )                |
| Leber / Milz (108)             | 37   | 0  | 17   | 3   | 5   | 46   | 57,4                   |
| Ovar (11)                      | 6    | 0  | 4    | 0   | 0   | 1    | 90,9                   |
| Legedarm (4)                   | 3    | 0  | 1    | 0   | 0   | 0    | ( 100 )                |
| Herz / Lunge (2)               | 1    | 0  | 1    | 0   | 0   | 0    | ( 100 )                |
| Serosa / LS (36)               | 18   | 0  | 10   | 1   | 3   | 4    | 88,9                   |
| Gelenk (1)                     | 1    | 0  | 0    | 0   | 0   | 0    | (100)                  |
| Summe                          | 126  | 0  | 38   | 9   | 9   | 74   | (= 256)                |
| Anteil an den Isolierungen (%) | 49,2 | 0  | 14,9 | 3,5 | 3,5 | 28,9 | (= 100)                |

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2016

### Serotypisierung zur Differenzierung von E. coli (2016)

93 Isolate aus Kloakentupfern (grün) vs. 163 Isolate aus Organen u. Serosa (rot)

Es bietet sich an einen E. coli für den stallsp. Impfstoff zu wählen, der aus Organen oder Serosa isoliert wurde und zum Serotyp O2 oder O78 gehört (mögliche höhere Invasivität und Pathogenität)

Man kann auch einen non(...) und einen O2 aus einem Sektionsgut nehmen, um sicher zwei verschiedene E. coli in den Impfstoff zu geben.

© Tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salsch, 06.06.2017

### EcoDIFF: Heterogenität bei O-Serotypen (O2, O18 u. O78 aber kein O1 2015 u. 2016 nachgewiesen)

|                               | nur O2 | nur O18 | nur O78 | andere | EC n.n. | O2 + O78 | O2 + O18 | O18 + O78 | n Betriebe |
|-------------------------------|--------|---------|---------|--------|---------|----------|----------|-----------|------------|
| Legehennen (35 Besuche* 2015) | 4      | 3       | 3       | 15     | 2       | 1        | 4        | 2         | 34         |
| Mast (20 Besuche* 2015)       | 2      | 1       | 2       | 11     | 2       | 0        | 0        | 0         | 18         |
| Legehennen (33 Besuche* 2016) | 10     | 4       | 2       | 12     | 0       | 1        | 1        | 0         | 30         |
| Mast (27 Besuche* 2016)       | 5      | 2       | 0       | 11     | 5       | 1        | 0        | 0         | 24         |

\*mit Folgebesuchen

Bei Legehennen öfter Nachweis von zwei Serotypen pro Betrieb wenn mindestens drei (2015) oder vier (2016) Proben genommen werden.

© Tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salsch, 06.06.2016

### MALDI-TOF – Hilfsmittel zur Differenzierung?

| Vollständiger Name (in alphabetischer Reihenfolge) | verwendete Abkürzung | Nachweise mit der höchsten Wahrscheinlichkeit |
|--|----------------------|---|
| 1 Escherichia coli 30083T HAM                      | 30083T               | Nein  |
| 2 Escherichia coli ATCC 25922 CHB                  | 25922C               | Ja  |
| 3 Escherichia coli ATCC 25922 THL                  | 25922T               | Ja  |
| 4 Escherichia coli ATCC 35218 CHB                  | 35218                | Nein  |
| 5 Escherichia coli B421 UFL                        | B421                 | Nein  |
| 6 Escherichia coli DHSalaha BRL                    | 5-alpha              | Ja  |
| 7 Escherichia coli DSM 682 DSM                     | 682                  | Ja  |
| 8 Escherichia coli DSM 1103 QC DSM                 | 1103                 | Ja  |
| 9 Escherichia coli DSM 1576 DSM                    | 1576                 | Ja  |
| 10 Escherichia coli ESBL EA RSS 1528T CHB          | 1528T                | Nein  |
| 11 Escherichia coli MB11464 1 CHB                  | 11464                | Ja  |
| 12 Escherichia coli Nissl WML                      | Nissl                | Nein  |
| 13 Escherichia coli RV 412 2010 06a LBK            | RV412_06             | Ja  |
| 14 Escherichia coli RV 412 A 1 2010                | RV412_A1             | Nein  |
| 15 Escherichia coli W3350 MMG                      | W3350                | Nein  |

Im Untersuchungs-gut wurde nur ein Teil der 15 Referenz-stämme als best match angeboten, und hiervon über 2 Jahre 3 Stämme häufiger als alle anderen.

© Tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salsch, 06.06.2017

### MALDI-TOF – Hilfsmittel zur Differenzierung?

| Ref-Stamm | Isolate (pos.) | Isolate (%pos.) | Betriebe (pos.) | Betriebe (% pos.) | LH | MK | Pu | G / E |
|-----------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|----|----|----|-------|
| 11464     | 43             | 36,8            | 28              | 70                | 19 | 7  | 2  | 0     |
| 682       | 31             | 26,5            | 20              | 50                | 16 | 2  | 1  | 0     |
| 5-alpha   | 19             | 16,2            | 15              | 37,5              | 9  | 4  | 0  | 2     |
| RV412_06  | 8              | 6,8             | 6               | 15                | 4  | 2  | 0  | 0     |
| 1576      | 6              | 5,1             | 6               | 15                | 5  | 0  | 0  | 1     |
| 1103      | 3              | 2,6             | 3               | 7,5               | 0  | 3  | 0  | 0     |
| 25922T    | 3              | 2,6             | 3               | 7,5               | 2  | 1  | 0  | 0     |
| 35218     | 2              | 1,7             | 2               | 5                 | 2  | 0  | 0  | 0     |
| Nissl     | 2              | 1,7             | 2               | 5                 | 1  | 1  | 0  | 0     |
| Summe     | 117            | 100             | s.u.            | (40 pos.)         |    |    |    |       |

EcoDIFF 2015

© Tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salsch, 06.06.2017

### Erkennt die Massenspektroskopie besonders geflügeltypische E. coli?

| Serotypisierung                | Haupt - E. coli - Referenzstämme |               |                   |                   |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------|-------------------|-------------------|
|                                | 11464 (n = 74)                   | 682 (n = 29)  | 5-alpha (n = 35)  | RV412_06 (n = 14) |
| NON (O1,O2,O18,O78)            | 50                               | 25            | 25                | 11                |
| O2                             | 22                               | 2             | 4                 | 2                 |
| O18                            | 2                                | 2             | 2                 | 0                 |
| O78                            | 0                                | 0             | 4                 | 1                 |
| Weitere E. coli-Referenzstämme | 1576 (n = 9)                     | 1103 (n = 12) | 25922 THL (n = 8) | 25922 CHB (n = 1) |
| NON (O1,O2,O18,O78)            | 4                                | 4             | 7                 | 1                 |
| O2                             | 2                                | 6             | 0                 | 0                 |
| O18                            | 1                                | 1             | 1                 | 0                 |
| O78                            | 2                                | 1             | 1                 | 0                 |

© Tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salsch, 06.06.2017

### MALDI-TOF – Hilfsmittel zur Differenzierung?

2016

Es dominieren als best match die Referenzstämme 11464, 682 und 5-alpha

Sind dies besonders geflügelaffine E. coli?

© Tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salsch, 06.06.2017

### Mehr Info zu den E. coli-Stämme bei Bruker? („History“ bei ATCC, PubMed, DSMZ (DSM), Google usw.)



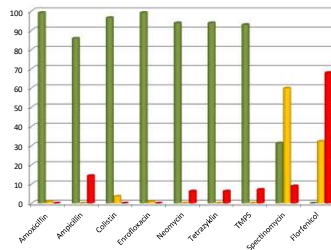
DSM 1103 ist ein Tochterisolat von ATCC 25922 (straininfo.net)  
 ATCC 25922 gehört zum Serotyp O6 (ATCC.org)  
 ATCC 25922 erzeugt kein Verotoxin (PubMed)  
 ATCC 35218 wurde erstmals aus einem Hund isoliert (ATCC.org)  
 30083T HAM = ATCC11775 gehört zum Serotyp O1 (ATCC.org)  
 DSM1576 = ATCC8739 wurde aus Kot isoliert (wessen Kot?) (ATCC.org)

**Eine Liste „isoliert aus Organ/Kot, aus Tierart /Mensch oder gehört zu Serotyp O...“ ist mit vertretbarem Zeitaufwand nicht zu erstellen.**

Die wichtigen O-Typen kommen ohnehin bei mehreren Tierarten und dem Menschen vor. Bei EcoDIFF zudem keine Korrelation zwischen den 4 Serotypen und den „best matches“ im MALDI-TOF erkennbar.

(Vermutl. O-LPS zu geringer Anteil am Bakterium oder phys. zu ähnlich).

### Sensitivität von E. coli Isolaten (LH)

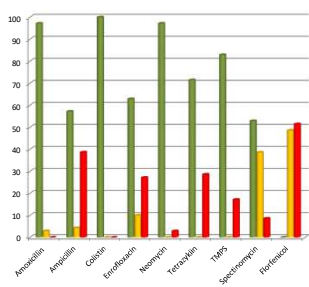


2016  
 112 Isolate von  
 32 Betrieben

■ LH 5 gesamt (%)  
 ■ LH 1 gesamt (%)  
 ■ LH R gesamt (%)

In EcoDIFF kaum Resistenzen gegen die bei Legehennen zugelassenen und verwendeten Antibiotika

### Sensitivität von E. coli Isolaten (Mast)



2016  
 70 Isolate von  
 27 Betrieben

■ Mast 5 gesamt (%)  
 ■ Mast 1 gesamt (%)  
 ■ Mast R gesamt (%)

Hier wäre die Wahl eines resistenten Isolates z.B. gegen ENR oder TC sinnvoll für einen Inaktivat-Impfstoff

### Unterschiedliche Resistenzen bei den E. coli?



|               | AMX | AMP | COL | ENR | NEO | TC |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| G 3274 / 2015 |     |     |     |     |     |    |
| DS-Rest       | S   | R   | I   | R   | I   | S  |
| Leber 1       | S   | S   | S   | S   | S   | S  |
| Leber 2 →     | S   | R   | I   | R   | S   | S  |

Putenküken, 4. LT, gestorben  
 Ein Isolat wie aus Leber 2 wäre in der 4.-8. LW interessant.  
 Hier eher Hinweis auf Herkunft PET (s. Dottersack)

Alle 3 Serotyp non (O1, O2, O18, O78:K80)  
 Alle 3 MALDI-TOF E. coli 11464

### Unterschiedliche Resistenzen bei den E. coli?



|               | AMX | AMP | COL | ENR | NEO | TC |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| G 3253 / 2015 |     |     |     |     |     |    |
| Serosa 1      | S   | S   | S   | S   | S   | S  |
| Serosa 2 →    | S   | S   | I   | S   | S   | S  |
| Legedarm →    | S   | S   | I   | S   | R   | S  |

Legehennen, 11. Legemonat rezidivierende E. coli-Infektion, Herde vorbehandelt mit Colistin

Befund: fibrinöse Polyserositis und Salpingitis

Serotypisierung: Serosa 1 = non (...), Serosa 2 = **018**, Legedarm = **02**  
 MALDI-TOF: 11464, 682, 1103

Isolat aus dem Legedarm und Serosa 2 in einen stallsp. E. coli-Impfstoff?

### Hilft eine Genotypisierung weiter? (in Zukunft)



Comparative genomics of European avian pathogenic E. coli (APEC)  
 Phylogruppen, PCR-Untersuchungen, Sequenzierungen, Virulenzgene

Genogruppe 8 (26,5% Anteil) Serotypen O2, O4, O18  
 Genogruppe 1 (18,9% Anteil) Serotyp O78  
 Genogruppe 10 (15,8% Anteil) Serotypen O8, O45, O91. u.a.  
 Genogruppe 7 (14,7% Anteil) Serotypen O4, O24, O35 u.a.  
 Genogruppe 9 (13,7% Anteil) Serotypen O1, O16, O181 u.a.

Andere Genogruppen nur wenige Stämme (272 Isolate untersucht)

Cortoni et al. (2016), BMC Genomics, Nov 22, 17 (1) 960

Ein Impfstoff mit Vertretern aus 2 oder mehr Genogruppen ist über die Serotypisierung machbar.

Tatsächlich kamen bei EcoDIFF auch Nachweise von mehr als einem Serotyp (O1,O2,O18,O78) bei einem Besuch vor (üblicherweise 4 Tiere oder Proben)

## Was will uns dieser Vortrag sagen?



Es gibt über die Serotypisierung hinaus weitere sinnvolle Kriterien für die Auswahl der Isolate.

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2017

19

## Isolate für einen stallsp. E. coli-Impfstoff



- aus größerem Angebot auswählen (mehr Tiere u. Proben!)
- klinisches und pathologisches Bild als Hauptkriterien für die Auswahl aus Organen, Serosa u.a.
- Serotypisierungen als zweites Kriterium ob besser mehr als nur ein E. coli in den Impfstoff soll
- Hinweise auf Resistenzen ggf. als drittes Kriterium (keine Verdrängung, aber mögl. Reduzierung von Problemkeimen)
- Falls MALDI-TOF Daten vorhanden: häufiges „*best match*“? Geflügel-typisches Isolat? Ggf. viertes Kriterium
- Kombinationsimpfstoff mit anderen Bakterien erforderlich, z.B. Gallibacterium anatis?

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2016

20

## Wird zu viel oder zu wenig geimpft ?



Einzelne Inaktivimpfstoffe können durch Lebendimpfstoffe in der Aufzucht ersetzt werden.

Wird die tatsächliche Notwendigkeit regelmäßig überprüft? (Aktualisierung der Impfprogramme und der Isolate im stallsp. Impfstoff).

Bei stallspezifischen Impfstoffen wird häufig nicht vorgeimpft.

Impfungen und Arzneimittel können Hygiene- oder Managementmängel auf Dauer nicht kompensieren, aber den Tieren Entlastung und Zeitgewinn für den Aufbau von erworbener Immunität geben.

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 10.03.2017

21

## Danksagung für die ...



### Probenahmen:

Dr. Brüggemann, Dr. Hildebrand, Dr. Hirsch, TA Kleinhakenkamp, Dr. Nemeč, Dr. Salisch, FTÄ Sanmartin, Dr. F. Schmitt

### Pathologie:

Dr. Böhm, Dr. Kappe, Dr. Schade

### Bakteriologie:

Dr. Gangl, Fr. Otto, Dr. Schuhmacher, Fr. Schütz

### und Dank natürlich

dem BSTMELF und der BTSK, den teilnehmenden Landwirten und den Damen unserer Schreibbüros

© tiergesundheitsdienst bayern e.V., Dr. H. Salisch, 06.06.2017

22