

6. Zusammenfassung

Aufgrund der Bedeutung der Spezies *Serpulina hyodysenteriae* und *S. pilosicoli* als Durchfallerreger und Verursacher erheblicher Mastseinbußen beim Schwein ist eine sichere Identifizierung dieser Spezies in der Routinediagnostik von großem Interesse. Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war daher eine überprüfende Aufarbeitung der zur Differenzierung intestinaler Serpulinen in der Routinediagnostik üblicherweise genutzten kulturell-biochemischen Einordnungskriterien (Hämolysestärke, α -Galaktosidase-, α - und β -Glucosidaseaktivität, Indolbildung und Hippuratspaltung). Zu diesem Zweck wurden an 57 *Serpulina*-Isolaten, darunter zehn Typ- und Referenzstämmen aller zur Zeit bekannten *Serpulina*-Spezies sowie drei Isolaten vom Hund und einem Rattenstamm, vergleichende phänotypische und genotypische Untersuchungen vorgenommen.

Bei den phänotypischen Untersuchungen erwies sich Trypticase-Soja-Agar mit 10% Rinderblutzusatz in Verbindung mit der Beurteilung einer Hämolyseverstärkung im Sinne des Ringphänomens (KINYON et al. 1976) als sehr geeignet zur Untersuchung der Hämolysestärke. Ein etwaiger Vorteil einer Supplementierung verwendeter Nährböden mit 1% Ribonukleinsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Als anderen Methoden in der Sensitivität überlegene, schnelle und einfache Methode zur Überprüfung der Indolbildung bestätigte sich der Nachweis mittels der reaktiven Substanz p-Dimethylaminozimtaldehyd nach Aufnahme von *Serpulina*-Kulturmaterial auf sterile Watetupfer. Zeigte sich die Nutzung der entsprechenden Rosco Diagnostic Tablets zu diesem Zwecke ungeeignet, konnte die Hippuratspaltung mit diesem System einfach und reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Untersuchung der α -Galaktosidase ergab bei 55 von 57 Isolaten zwischen RapID ANA II-System und Rosco Diagnostic Tablets übereinstimmende Ergebnisse einer hohen Reproduzierbarkeit von 98 bzw. 100%. Beim Nachweis der α - und β -Glucosidase hingegen waren sowohl Vergleichbarkeit zwischen den beiden Systemen als auch Reproduzierbarkeit innerhalb des jeweiligen Systems deutlich niedriger. Das RapID ANA II-System lieferte, neben der insgesamt gegenüber Rosco Diagnostic Tablets geringeren Reproduzierbarkeit seiner Ergebnisse, außerdem häufig auch mit dem von vielen anderen

Autoren genutzt und in der *Serpulina*-Diagnostik üblichen API ZYM-System nicht übereinstimmende Ergebnisse, besonders beim Nachweis der β -Glucosidase, so daß dieses System für die *Serpulina*-Diagnostik weniger geeignet scheint.

Eine zweckmäßige Differenzierung der untersuchten Serpulinen mit kulturell-biochemischen Methoden war mittels der Merkmale Hämolyseintensität, α -Galaktosidase-, α - und β -Glucosidaseaktivität, Indolbildung sowie Hippuratspaltung möglich. Ein entsprechendes Differenzierungsschema wurde aufgestellt. Dabei konnten der Nachweis von α - und β -Glucosidase nicht zur Unterscheidung der einzelnen *Serpulina*-Spezies genutzt werden. Der Nachweis der Indolbildung eignete sich nur zur Differenzierung zwischen den schwach hämolysierenden Spezies *S. intermedia* und *S. murdochii*. Hingegen konnte ein indolpositiver *S. pilosicoli*-Stamm vom Hund gefunden werden, ebenso neun eindeutig indolnegative stark hämolysierende *Serpulina*-Isolate vom Schwein, welche vorläufig als indolnegative Varianten der Spezies *S. hyodysenteriae* bezeichnet wurden.

Diese Ergebnisse konnten durch die genotypische Untersuchung mit Hilfe der Makrorestriktionsanalyse nach Verdau der chromosomalen DNA mittels des Restriktionsenzym *Mlu*I bestätigt werden. 51 der zuvor phänotypisch differenzierten *Serpulina*-Stämme wurden mit dieser Methode untersucht und konnten in 40 elektrophoretische Typen sowie sechs Gruppen eingeordnet werden. Fünf Gruppen entsprachen den fünf derzeit bekannten *Serpulina*-Spezies vom Schwein (*S. hyodysenteriae*, *S. intermedia*, *S. murdochii*, *S. innocens* und *S. pilosicoli*), eine Gruppe enthielt die untersuchten *S. pilosicoli*-Isolate vom Hund und Ratte. Dabei lagen die phänotypisch als indolnegative Varianten der Spezies *S. hyodysenteriae* eingeordneten Isolate in der entsprechenden Gruppe gemischt mit den indolpositiven *S. hyodysenteriae*-Stämmen vor, ein indolpositives *S. hyodysenteriae*-Isolat (A 5970/96) zeigte ein zu sechs der indolnegativen Isolate identisches Restriktionsfragementmuster. Die Eignung des Stammes B 256 als *S. innocens*-Typstamm muß angezweifelt werden, da dieser Stamm als einziges Isolat dieser Untersuchungen pulsfeldgelelektrophoretisch nicht entsprechend seiner biochemischen Eigenschaften eingeordnet werden konnte, vielmehr als eigenständiger Zweig der *S. intermedia*-Gruppe.

Anhand der in diesen Untersuchungen erzielten Ergebnisse wurden schließlich die Untersuchungsergebnisse der *Serpulina*-Routinediagnostik des Jahres 1997 am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover ausgewertet. Dabei ergab sich ein Anteil der indolnegativen, stark hämolyzierenden *Serpulina*-Isolate an den insgesamt untersuchten *Serpulina*-Stämmen von annähernd 50% (91 von 183 untersuchten Isolaten). Die Bedeutung dieser häufig aus Beständen mit Dysenterie-Problematik isolierten indolnegativen Varianten der Spezies *S. hyodysenteriae* im nordwestdeutschen Raum wird hierdurch verdeutlicht. *S. pilosicoli* hingegen konnte während des gesamten Jahres nicht ein einziges Mal nachgewiesen werden.

Summary

Feltrup, Carsten: Phenotypic and genotypic differentiation of intestinal *Serpulina* strains isolated from the porcine gut

Considering the importance of the species *Serpulina hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* as cause of intestinal diseases in pigs responsible for relevant production losses, their reliable identification in routine diagnostics is of great interest. Therefore, the primary aim of this study was to evaluate the most commonly used biochemical and cultural criteria for classifying *Serpulina* strains (hemolysis, α -galactosidase, α - and β -glucosidase activity, indole production, hippurate cleaving capacity). To this purpose comparative phenotypical and genotypical investigations including a total of 57 *Serpulina* isolates, among them ten type- and reference-strains of the known *Serpulina* species as well as three isolates from dogs and one from a rat, were carried out.

For investigation of the phenotype trypticase soy agar with 10% ox blood in connection with the ring phenomenon (KINYON et al. 1976) proved to be very effective in evaluating hemolytic patterns. An advantage of supplementing media with 1% ribonucleic acid could not be shown. Determining the ability of *Serpulina* isolates to produce indole by adding p-

dimethylaminocinnamaldehyde to bacterial growth collected on a cotton swab was confirmed to be simple, rapid and more sensitive than other methods. For this purpose Rosco Diagnostic Tablets were not suitable, whereas detection of hippurate hydrolysis was simple and reproducible using this system. The investigation of α -galactosidase activity in 55 of 57 cases yielded results correlating with RapID ANA II and Rosco Diagnostic Tablets and showing high reproducibility (98% and 100%, respectively). However, comparability between both systems and reproducibility of each system on its own were clearly lower investigating α - and β -glucosidase. Furthermore the RapID ANA II panel, which in addition showed lower reproducibility than Rosco Diagnostic Tablets, often provided results not corresponding to those of other authors using the common API ZYM system, especially when concerning detection of β -glucosidase activity. Therefore, the RapID ANA II system seems to be less suitable for *Serpulina* diagnostics.

A useful differentiation of the investigated *Serpulina* strains by cultural and biochemical means was possible by examining hemolysis, α -galactosidase, α - and β -glucosidase activity, indole production and hippurate hydrolysis. A differentiation scheme based on these characteristics is presented. Detection of α - and β -glucosidase could not be utilized to differentiate between the *Serpulina* species, and detection of indole production only differentiated between the weakly hemolytic species *S. intermedia* and *S. murdochii*. In contrast one atypical, indole positive canine *S. pilosicoli* isolate was found, as well as nine indole negative, strongly hemolytic porcine *Serpulina* strains, provisionally called indole negative variants of *S. hyodysenteriae*.

These results were confirmed genotypically by means of macrorestriction fragment profile analysis using *Mlu*I restriction enzyme. A total of 51 of the isolates analyzed phenotypically could be differentiated into 40 electrophoretic types and six major clusters. Five of these clusters corresponded to the five known porcine *Serpulina* species (*S. hyodysenteriae*, *S. intermedia*, *S. murdochii*, *S. innocens*, *S. pilosicoli*), one cluster contained the *S. pilosicoli* isolates from dog and rat included in this study. The isolates designated as indole negative variants of *S. hyodysenteriae* were found to be located in a single cluster with the indole positive *S. hyodysenteriae* strains, with one indole positive *S. hyodysenteriae* isolate

(A 5970/96) showing exactly the same banding pattern as six of the indole negative isolates. The only strain in this study for which the biochemical classification did not correlate with its grouping obtained by macrorestriction analysis was the *S. innocens* type strain B 256. Therefore the suitability of this isolate as a type strain should be reconsidered, since this strain even formed a separate branch of the *S. intermedia* cluster.

Applying the conclusions provided by this study the results of the *Serpulina* routine diagnostics in 1997 at the Department of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine Hannover, were analyzed. Indole negative, strongly hemolytic strains formed almost 50% (91 of 183) of all the investigated *Serpulina* isolates. Therefore, the importance of indole negative variants of *S. hyodysenteriae*, which are often isolated from herds affected by swine dysentery, is clearly underlined for the north-western part of Germany. *S. pilosicoli*, however, could not be detected in any case.