

Pathogenen *E. coli* auf der Spur

Nachweis von STEC/EHEC-Bakterien in deutschen Rinderbeständen

L. Geue, M. Segura-Alvarez, F. J. Conraths (Wusterhausen) und P. Gallien (Dessau)

Im Jahre 1885 beschrieb der deutsche Kinderarzt Theodor Escherich (1857-1911) erstmalig ein "*Bakterium coli commune*". Er konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ahnen, dass das später nach ihm benannte Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) einmal zum molekular am besten verstandenen Lebewesen überhaupt aufsteigen und das wichtigste Modellobjekt von Genetikern und Molekularbiologen sein würde. Zeit seines Lebens war Escherich davon überzeugt, mit *E. coli* einen harmlosen Darmbewohner entdeckt zu haben. Heute wissen wir jedoch, dass neben diesen harmlosen *E. coli*-Bakterien, die den gesunden Darm von Menschen und Tieren besiedeln, eine ganze Reihe von pathogenen Formen existieren, die verschiedene Infektionskrankheiten verursachen können.

Escherichia coli gehört zur Familie der Enterobacteriaceen, zu denen auch Krankheitserreger wie Salmonellen und Shigellen, die Erreger der Ruhr, zählen. Obwohl *E. coli* beim Menschen eine wichtige Rolle beim Erhalt der Darmphysiologie spielt, wurden in den letzten Jahren auch zahlreiche Stämme nachgewiesen, die zu verschiedenen Darmerkrankungen mit Durchfällen führen.

Die Identifizierung von verschiedenen Virulenzfaktoren bei *E. coli*-Keimen hat zu einer Unterteilung der enteropathogenen (den Darmschädigenden) *E. coli* in gegenwärtig sieben verschiedene Gruppen geführt. Hauptkriterien für die Klassifizierung sind – neben den klinischen Symptomen – die von den Stämmen gebildeten Adhäsionsfaktoren und Toxine (Giftstoffe).

Eine dieser Gruppen besteht aus den Shiga-Toxin-bildenden *E. coli* (STEC). Diese Bakterien produzieren Zellgifte, die den Toxinen der Ruhr-Erreger (Shigellen) chemisch sehr ähneln.

Europa, nachgewiesen worden. Beschrieben sind aber auch Erkrankungen bei Nutztieren, zum Beispiel blutiger Durchfall bei Kälbern und Hunden. Es handelt sich um die bislang einzige Gruppe darmpathogener *E. coli*, für die ein Zoonose-Charakter nachgewiesen wurde (unter Zoonosen werden Krankheiten verstanden, die vom Tier auf den Menschen oder umgekehrt übertragen werden können).

Shiga-Toxine bestehen aus sechs Untereinheiten: Fünf B-Untereinheiten, welche die spezifische Bindung an Rezeptoren eukaryotischer Zellen vermitteln, sowie einer A-Untereinheit mit toxischer Aktivität. Infolge dieser Aktivität sind STEC in der Lage, die Eiweißsynthese eukaryotischer Zellen zu hemmen und so deren Zelltod herbeizuführen. Innerhalb der Shiga-Toxin-Familie wird

WELTWEIT VERBREITETE KRANKHEITSERREGER

Die STEC wurden erstmalig 1982 in den USA durch das dortige Center for Disease Control als Ursache menschlicher Erkrankungen festgestellt. Seither sind sie weltweit, vor allem in Nordamerika, Japan und



zwischen dem Shiga-Toxin 1 (Stx1) und verschiedenen Shiga-Toxin 2 (Stx2)-Varianten unterschieden.

Die durch zahlreiche Zeitungsmeldungen bekannten EHEC (Enterohämorrhagische *E. coli*) sind eine Untergruppe der STEC. Sie können beim Menschen verschiedene Krankheiten verursachen, zum Beispiel die hämorrhagische Colitis (HC) mit schweren blutigen Durchfällen, oft verbunden mit Bauchkrämpfen, Erbrechen und Fieber oder das hämolytisch urämische Syndrom (HUS), das zu akutem Nierenversagen führen kann.

VERBREITUNG SOLL GEKLÄRT WERDEN

Zwei Arbeitsgruppen erforschen zurzeit gemeinsam das Vorkommen von STEC in deutschen Rinderbeständen: Wissenschaftler aus dem Institut für epidemiologische Diagnostik der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV) in Wusterhausen und aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Dessau. Das Forschungsprojekt wird aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung,

des Erregers geklärt sowie Fragen zu Kontaminationen der Umwelt (Weiden, Anreicherungen in den Ställen) beantwortet werden. Auch die mögliche Gefährdung des Betreuungspersonals wird berücksichtigt.

Mit molekular-epidemiologischen Methoden sollen Einschleppungs-, Übertragungs- und Ausbreitungsmechanismen aufgeklärt werden, um Infektionsketten zielgerichtet unterbrechen zu können.

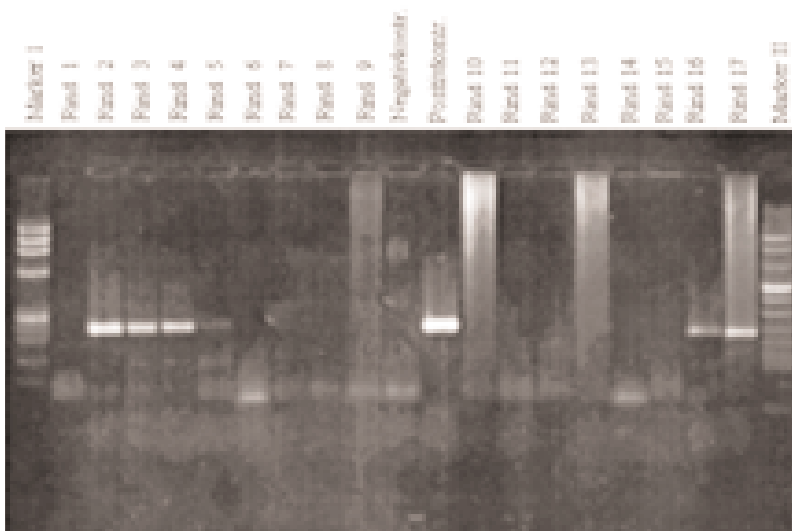
AUFWENDIGE CHARAKTERISIERUNG

Für das Projekt wurde eine aufwendige Methodenkaskade etabliert, mit deren Hilfe STEC-Einzelkolonien isoliert und anschließend charakterisiert werden können.

Zunächst gilt es herauszufinden, ob die Rinder mit STEC-Pathogenen infiziert sind. Das ist auf zweierlei Weise möglich: Nach Entnahme von Rinderkotproben mittels Tupfern werden die Proben im Labor zunächst in jeweils zwei verschiedenen Nährmedien vorangereichert. Daran schließen sich die beiden Vorscreening-Methoden an. Aus der einen Anreicherungskultur werden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Gene nachgewiesen, die für Shiga-Toxine kodieren (Abb. 1). Die andere Kultur dient zur Vorbereitung eines Shiga-Toxin-ELISA mit monoklonalen Antikörpern. Mit diesem Test wird das Shiga-Toxin, also das Protein selbst, nachgewiesen.

Im Falle einer positiven Reaktion in einem oder beiden Vorscreening-Tests werden Einzelkolonien von Shiga-Toxin bildenden *E. coli* isoliert.

Abb. 1: Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels Agarose-Gelelektrophorese: Die Untersuchungsproben der Rinder 2, 3, 4, 5 sowie 16 und 17 zeigen, ebenso wie die Positivkontrolle, die Bande für die Shiga-Toxin-Gene. Diese Tiere sind also mit STEC infiziert.



WIEDERKÄUER ALS RESERVOIR

Als Hauptreservoir für STEC werden Rinder und andere Wiederkäuer angesehen. In verschiedenen Regionen der Erde wurden bei Rindern STEC nachgewiesen, die identisch mit Isolaten vom Menschen waren.

Bei Erkrankungsausbrüchen wurden als Infektionsquellen überwiegend unzureichend gegartes Rinderhackfleisch (z. B. in Hamburgern), nicht pasteurisierte Milch oder Produkte aus Rohmilch identifiziert (vgl. ForschungsReport 1/96). Daneben spielen direkte Kontakte mit Tieren, aber auch der Kontakt mit infizierten Menschen eine nicht unerhebliche Rolle.

Landwirtschaft und Forsten (BML) finanziert.

Obwohl international schon epidemiologische Studien zum Vorkommen von STEC bei Rindern vorliegen, gibt es noch keine Langzeituntersuchungen wie in diesem Forschungsprojekt von BFAV und BgVV.

Im Rahmen der Studie werden in vier Agrargenossenschaften in den Bundesländern Brandenburg und Sachsen-Anhalt jeweils Gruppen von 25 bis 30 Rindern von der Geburt über die Aufzuchtphase, die Mastphase bis hin zur Schlachtung und zum Schlachtkörper auf das Vorkommen von STEC untersucht. Dabei sollen mögliche Zusammenhänge zwischen Störungen der Tiergesundheit und dem Auftreten



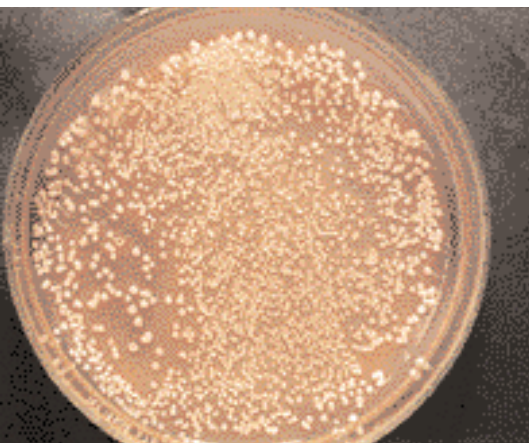


Abb. 2a: McConkey-Agar-Platte mit darauf befindlichen *E. coli*-Kolonien (Master-Platte).

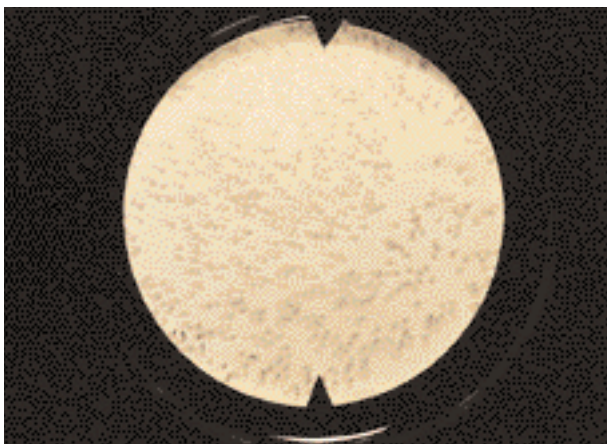


Abb. 2b: Dazugehörige Nylonmembran nach Hybridisierung und Detektion. Die darauf befindlichen violetten Punkte stellen die *stx*-Gen tragenden Kolonien dar. Diese müssen nun den Originalkolonien auf der Master-Platte zugeordnet werden.

Dazu werden die Voranreicherungen verdünnt und auf Petrischalen mit Nährmedium (McConkey-Agar) ausplattiert (Master-Platte, Abb. 2). Nach Bebrütung über Nacht wachsen Einzelkolonien, die anschließend auf Nylonmembranen transferiert werden. Die Nylonmembranen werden nach mehreren Arbeitsschritten mit einer *stx1/2*-DNA-Sonde hybridisiert. Kolonien, die die Gene zur Produktion der *Stx1*- oder *Stx2*-Toxine besitzen, verraten sich durch eine Farbreaktion und sind dadurch auffindbar (Abb. 2). Jeweils zehn dieser

positiven Kolonien müssen ihren Originalen auf der Master-Platte zugeordnet und in die Stammhaltung übernommen werden. Sie stehen dann für weitere Charakterisierungsschritte zur Verfügung.

Die Charakterisierung jeder Einzelkolonie erfolgt durch den Nachweis bestimmter Virulenzgene oder den Nachweis von Genprodukten. Nach der Charakterisierung ist es möglich, bestimmte klonale Zusammenhänge zwischen verschiedenen *E. coli* herzustellen beziehungsweise

auszuschließen. So ist ein besseres Verständnis für die epidemiologischen Zusammenhänge und das Verhalten bestimmter Klone im Tier und in der Gruppe möglich.

DAS VORKOMMEN VARIERT

In unserer Studie ermittelten wir in den einzelnen Untersuchungsgruppen eine STEC-Nachweisrate zwischen 29 % und 53 %. Dabei gab es über den gesamten Untersuchungszeitraum erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Beständen. Auch die Nachweis Häufigkeit von STEC innerhalb einer Untersuchungsgruppe differierte zwischen den einzelnen Probenentnahmen zeitweise erheblich.

Dies dürfte einerseits daran liegen, dass STEC-infizierte Einzel-

tiere die Bakterien nicht dauernd ausscheiden, deutet andererseits aber auch auf ein Zirkulieren des Erregers und eine damit verbundene Rückinfektion der Tiere im Bestand hin. Alternierende Ausscheidung beziehungsweise das sich ständige Ablösen von Phasen des Nachweises und Phasen des Nichtnachweises des Erregers ist nach unseren Erkenntnissen die Regel. In der Studie konnten STEC mit zusätzlichen EHEC-Virulenzmarkern in allen vier untersuchten Rindergruppen isoliert werden. Typen mit kompletten Virulenzmustern lassen sich dabei nur sehr wenigen Serovaren zuordnen. Dabei spielen unter anderem die Serovare O26 und O157 eine wichtige Rolle. Diese Serovare werden vielfach für schwerwiegende Erkrankungen beim Menschen verantwortlich gemacht. Nach unseren Erkenntnissen scheint das Auftreten von STEC in Rinderbeständen die Regel zu sein. Auch das Vorkommen typischer EHEC ist eher die Regel als die Ausnahme, wobei es keine Hinweise darauf gab, dass diese Isolate bei den Rindern Krankheiten hervorrufen.

Da grundsätzlich die Hypothese gilt, dass STEC-Isolate von Wiederkäuern schwerwiegende Infektionen beim Menschen verursachen können, sollte das gesundheitliche Risiko, das von diesen Erregern für den Verbraucher und besonders auch für das Betreuungspersonal ausgeht, nicht unterschätzt werden.

Um zu prüfen, ob STEC in den Rinderbeständen zurückgedrängt werden können, beispielsweise durch eine Änderung der Fütterung oder durch Impfung, sind weitere Forschungsarbeiten notwendig. ■

Dr. Lutz Geue, Tierärztin Montserrat Segura-Alvarez, PD Dr. Franz J. Conraths, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für epidemiologische Diagnostik, Seestr. 55, 16868 Wusterhausen; Dr. habil. Peter Gallien, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Jahnstr. 8, 06846 Dessau.

