

1. Einleitung

Escherichia coli (*E. coli*) ist der häufigste Erreger bakterieller Infektionen beim Menschen. Fakultativ pathogene Stämme von *E. coli* sind Bestandteil der physiologischen Darmflora. Sie können unter bestimmten Bedingungen extraintestinale Infektionen hervorrufen. Zum Spektrum gehören Harnwegsinfektionen, Cholezystitis, Appendizitis, Peritonitis, postoperative Wundinfektionen, Meningitis bei Neugeborenen und Lebensmittelvergiftungen.

Obligat pathogene, sogenannte enteropathogene *E. coli*, verursachen etwa 30 % aller Durchfälle bei Menschen weltweit. In Entwicklungsländern ist der Anteil noch höher einzuschätzen. Neben Kindern, bei denen fulminante Krankheitsverläufe mit wässrigen oder blutigen Durchfällen, Lebensmittelvergiftungen und das Hämolytisch- Urämische Syndrom (HUS) auftreten können, sind besonders Fernreisende von Infektionen betroffen.

1.1. Stand der Forschung

1.1.1. Enteropathogene *E. coli*

Nach den unterschiedlichen Erkrankungsbildern werden 5 verschiedene Typen enteropathogener *E. coli* unterschieden: Enterotoxigene (*ETEC*), Enteropathogene (*EPEC*), Enterohämorrhagische (*EHEC*=Verotoxinbildende=*VTEC*), Enteroinvasive (*EIEC*) und Enteroaggregative (*EaggEC*).

Die Inzidenz von *EHEC*- Fällen in Deutschland lag 2001 bei 1,2/100.000, für die anderen Pathovaren insgesamt bei 6,2/100.000 gemeldeten Fällen im Bundesdurchschnitt und 18/100.000 in den neuen Bundesländern (73).

EHEC haben ein tierisches Reservoir und sind nicht speziesspezifisch für den Menschen, d.h., daß dieselben Stämme als Krankheitserreger bei Menschen, Rindern, aber auch anderen Haustieren in Erscheinung treten. Von *ETEC*, *EPEC* und *EaggEC* sind dagegen überwiegend speziesspezifische, human- oder tierpathogene, Stämme bekannt (63-69). *EIEC* sind als ausschließlich humanpathogen beschrieben. Tabelle 1 zeigt die wesentlichen Charakteristika enteropathogener *E. coli*.

	<i>ETEC</i>	<i>EPEC</i>	<i>EHEC (VTEC)</i>	<i>EIEC</i>	<i>EaggEC</i>
Klinische Charakteristik der Diarrhoe	Wässrig, choleraartig; Reisediarrhoe Lebensmittelvergiftungen	Wässrig; Säuglingsdyspepsie	80% wässrig, 20% blutig, 10% extra-intestinale Manifestation, bis 10% Letalität	Ruhrartige Erkrankung, 90%wässrig, 10%blutig	Wässrig, persistierend
Auftreten	Weltweit, Häufung in tropischen Regionen	Entwicklungsländer, insbes. Kleinkinder	weltweit	weltweit, v. a. Entwicklungsländer, lokale Ausbrüche	Entwicklungsländer, insbes. Asien insbes. Kleinkinder
Reservoir	Mensch	Mensch	Mensch, Rinder, Haustiere	Mensch	Mensch
Transmission	Kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser	Kontaminierte Lebensmittel Schmierinfektion	Kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser	Kontaminiertes Trinkwasser, Lebensmittel und direkt	Kontaminiertes Trinkwasser

Tab. 1: Enteropathogene *E. coli* - Pathovare

Unter dem Begriff diffus adhärierend (*DAEC*) wurden in den letzten Jahren weitere *E. coli* subsummiert. Von diesen Stämmen ist jedoch zu wenig bekannt, um eine Aussage über ihren Stellenwert treffen zu können.

Für die Zuordnung von *E. coli*- Stämmen zu den genannten Krankheitsbildern wurden in der Vergangenheit die O- und H- Antigene mittels serologischer Methoden bestimmt. Die Kombination der Antigene determinierte hierbei den Serotyp bzw. Serovar.

Serovare wurden mit klinischen Krankheitsbildern assoziiert, allerdings ist dieser Zusammenhang heute nicht mehr haltbar, denn die Virulenz der Stämme hängt wesentlich von ihrer genetischen Ausstattung ab, welche durch mobile Genelemente einem Wandel unterzogen sein kann.

Um den ursächlichen Zusammenhang zwischen Virulenzfaktoren bestimmter *E. coli*-Stämme und dem klinischen Bild zu verdeutlichen, wird heute der Begriff **Pathovar** verwendet.

Die Entstehung pathogener *E. coli*- Stämme läßt sich teilweise ins 20. Jahrhundert datieren (29, 70). Als Mechanismus wird horizontaler Gentransfer zwischen Stämmen oder Spezies via Plasmiden oder Phagen angenommen (siehe unter 1.1.2.3.), wobei sehr Phagenproduktive *E. coli*- Stämme als ‚phage factories‘ bezeichnet werden. Identische Genabschnitte wurden zwischen *Salmonella ssp.* und *E. coli* (*EHEC*, *EPEC*, *EaggEC*), *Shigella ssp.* und *E. coli* (*EIEC*, *EHEC*), *Yersinia enterocolitica* und *E. coli* (*ETEC*, *EPEC*, *EaggEC*) sowie *Vibrio cholerae* und *ETEC* gefunden (40, 46, 50, 72).

Abhängig von ihrer genetischen Ausstattung können etliche Stämme enteropathogener *E. coli* unterschiedliche klinische Bilder auslösen: Stämme, die O 26, O 55, O 111, O 113, O 117, O 157:H- tragen, können *EHEC* sein (20), aber auch andere klinische Bilder zeigen oder avirulent sein, Stämme des Serovars O 111 können *EaggEC*, *EPEC* oder *EHEC* sein (43, 31, 33, 61), Stämme des Serovars O 26 sind die häufigsten *EHEC* (*VTEC*) bei Rindern und die häufigsten humanpathogenen *EHEC* in Entwicklungsländern, aber auch als *EPEC*-Stämme beschrieben. Stämme des Serovars O86, insbesondere O86: K61, sind als pathogene wie auch apathogene (86) *E. coli*, als *EPEC* (79), *ETEC* (77), *EaggEC* (78, 84), *EHEC* (78) oder uropathogene *E. coli* (81), sowohl bei Menschen (76-83) als auch bei Vögeln (83, 85) und Rindern (76) in der Literatur beschrieben worden.

Für den Nachweis enteropathogener *E. coli* liegen noch keine einheitlichen Standards vor. Es gibt für Deutschland lediglich eine Empfehlung, den Nachweis molekularbiologisch zu führen (3). Nachdem klar wurde, daß biochemische und serologische Marker für die Diagnostik enteropathogener *E. coli* unbrauchbar sind, wurden Anstrengungen unternommen, die Diagnostik auf den Nachweis der für die Pathogenität verantwortlichen Virulenzfaktoren zu begründen. Bereits vor über 20 Jahren wurde die Phänotypisierung, d.h. die Beurteilung nach dem Verhalten in der Zellkultur, zum Nachweis enteropathogener *E. coli* genutzt und blieb lange Zeit der ‚Goldstandard‘ in der Diagnostik (1). Die Fähigkeit zur Entwicklung von Virulenzfaktoren, die ein Adhärenz an Epithelien ermöglichen, ist aber kein zuverlässiger Marker für die Fähigkeit zur Toxin- Bildung. In der Veterinär- wie auch in der Humanmedizin wurde weiterhin der Nachweis von Zytotoxizität an Verozellen zum Nachweis von *VTEC* bzw. *EHEC* genutzt (‚*Verotoxine*‘, heute: *SLT*). Der Nachweis von Enterohämolysin wurde ebenfalls in der *EHEC*- Diagnostik eingesetzt, war aber nicht spezifisch für O157, wiederum nicht sensitiv genug für *EHEC* (29). Der Nachweis des

Hitzestabilen Toxins der *ETEC* wird teilweise bis heute durch Inokulation anhand neugeborener Mäuse geführt (107). Molekulare Methoden, wie die DNS- Hybridisierung, revolutionierten die Diagnostik enteropathogener *E. coli*. Der Einsatz von DNS- Proben ist ein bis heute anerkanntes Verfahren für den Toxin- Nachweis der *ETEC* (*LT* und *ST*). Daneben wurde ein enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) zum Nachweis von *SLT* (*EHEC*) auf Proteinebene entwickelt, der bislang als zuverlässigster Marker für den Nachweis von Toxinen aus der Bakterienkultur und aus dem Stuhl eingesetzt wird (2, 3, 98). Der Serotyp O157: H7 der *EHEC* nimmt eine Sonderstellung in der Diagnostik ein, weil er sich durch besondere biochemische Eigenschaften (fehlende Säurebildung aus Sorbitol, keine β - Glucuronidase) konventionell nachweisen läßt. Allerdings wurden z.B. 2001 nur 30,6% aller *EHEC*- Infektionen in Deutschland durch O157- positive Stämme verursacht (73). Letztlich sind die verschiedenen Methoden in der Regel angewiesen auf Kultivierung. Häufig sind sie Zeit- und arbeitsintensiv, dazu hinsichtlich Sensitivität und Spezifität heterogen. Die Entwicklung eines PCR- gestützten Virulenzfaktor- Nachweises ist daher zur Zeit das favorisierte Thema in der Diagnostik enteropathogener *E. coli*.

1.1.2. Klinik, Epidemiologie und Virulenzfaktoren enteropathogener *E. coli*

1.1.2.1. Enterotoxigene *E. coli* (*ETEC*)

Enterotoxigene *E. coli* (*ETEC*) sind weltweit als Erreger der Reisediarrhoe, als Auslöser akuter Diarrhoen bei Kindern in Entwicklungsländern (52, 101, 102) und Verursacher von Ausbrüchen durch Lebensmittelvergiftungen (99-107) bekannt. Sie verursachen wässrige Durchfälle und bedrohen durch den hohen Wasser- und Elektrolytverlust das Leben des Patienten.

Die Übertragung erfolgt durch kontaminiertes Trinkwasser und Lebensmittel (67). Hauptreservoir humanpathogener *ETEC* ist der Mensch. Der Mechanismus von Infektion und Erkrankung ist bei mensch- und tierpathogenen *ETEC* identisch, allerdings ist über Unterschiede am Fimbrien- Adhäsion eine relative Speziespezifität gewährleistet (64, 66). *ETEC* exprimieren 2 Typen von Virulenzfaktoren: Fimbrien (Pili), mit denen sie am Ileumepithel adhären, und Enterotoxine. Letztere sind Plasmid- codiert und können in 2 verschiedene Klassen eingeteilt werden: Hitzestabile (*ST*-) und hitzelabile (*LT*-) Toxine.

Das LT zeigt auf DNA- Ebene große Ähnlichkeit mit dem Cholera- Toxin und wirkt über eine Aktivierung der Adenylatzyklase in Darmepithelien, während ST eine heterogene Gruppe kleinerer Enterotoxine darstellen, welche über die Aktivierung der Guanylatzyklase wirken (49, 52).

1.1.2.2. Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC)

EPEC sind als Erreger wässriger Durchfälle bei Neugeborenen, v.a. in Entwicklungsländern, bekannt und werden auch Dyspepsie- Coli genannt. Die Namensidentität dieses Pathovars mit der gesamten Gruppe ist historisch bedingt.

Eine Übertragung erfolgt mittels kontaminierten Trinkwassers oder Schmierinfektion, wobei der Klinikhygiene große Bedeutung zukommt.

Hauptreservoir humanpathogener *EPEC* ist der Mensch, wobei die Speziesspezifität von human- und tierpathogenen *EPEC* mitunter in Frage gestellt wird (68).

EPEC produzieren keine Entero- oder Shiga like- Toxine. Sie besitzen sogenannte ‚Bundle Forming Pili‘ (bfp), für die das EAF- Plasmid (Enteroadherent Factor) kodiert. Pili sind verantwortlich für Autoaggregation und die sog. ‚Localized Adherence‘ (LA- Phänotyp) an der Dünndarm- Mucosa, was als erster Schritt der Infektion angesehen wird. Im 2. Schritt werden mit einem Typ- III- Sekretionsapparat Proteine der ‚molekularen Spritze‘ (esp) in die Wirtszelle eingebracht, die eine zelluläre Reorganisation auslösen und die Ankoppelung des Intimin ermöglichen. Der 3. Schritt der Infektion ist gekennzeichnet durch Intimin- vermittelte Anheftung und Aktin- Akkumulation , was zur typischen LA- Läsion in der Zellkultur beiträgt. Die N- terminale Region der BFP- Sequenz ist bei *EPEC* und *Vibrio cholerae* homolog (40). Aufgrund der Unspezifität des EAF- Plasmids sowohl innerhalb der Pathovare Enteropathogener *E. coli* als auch in anderen Spezies erscheint der Nachweis *EPEC*- spezifischer BFP- Sequenzen sinnvoller als der des vormals verwendeten EAF- Plasmids (31, 37, 38, 39).

1.1.2.3. Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

EHEC sind durch ihre Fähigkeit zur Bildung von Shiga- like- Toxinen (auch Shiga- oder Verotoxine genannt) gekennzeichnet.

80% der durch *EHEC*- Infektionen ausgelösten Durchfälle sind wässrig, 20% blutig.

Intestinale Komplikationen können bei Erwachsenen als chronische Kolitis (DD der Colitis ulcerosa), bei Säuglingen als nekrotisierende Kolitis und Invagination des Darmes bis hin zum Ileus auftreten.

Bei blutigen Durchfällen stellen Kinder und alte Menschen die Risikogruppen für intestinale und extraintestinale Infektionen dar. Bei letzteren kommt es in bis zu 10% zum Hämolytisch- Urämischen Syndrom (hämolytische Anämie, Urämie, Multiorganversagen). In 50% aller HUS- Fälle kommt es zu bleibenden schweren Schäden, in bis zu 10% aller HUS- Fälle zu letalem Ausgang. Die Letalität der Folgeerkrankungen insgesamt liegt bei 5-10 % (18).

Die Übertragung erfolgt durch Lebensmittel, z.B. ‚Hamburger‘, Kuhmilch (88) und kontaminiertes Trinkwasser (73, 87).

Als Reservoir sind vor allem Rinder, aber auch Schafe und Ziegen bekannt (63, 73).

Die Inzidenz von *EHEC*- Infektionen betrug 2001 1,2/100.000 (gegenüber 6,2/100.000 der anderen Pathovaren). In Deutschland wurden 2001 30,6% aller gemeldeten *EHEC*- Infektionen durch O157, 16,3% durch O102 und 12,2% durch O26 ausgelöst. Betrachtet man nur die HUS- Fälle, so wurden 78,1% durch O157 und weitere 7,3% durch O26 verursacht. Über die Hälfte der *EHEC*- Infektionen betraf Kinder unter 5 Jahren (73).

Der derzeit häufigste Serovar, O157, löste 2001 in Deutschland 1/3 aller *EHEC*- Infektionen aus, war aber gleichzeitig für 3/4 aller HUS- Fälle verantwortlich (73). Bekannt wurde dieser Serovar, als er vor wenigen Jahrzehnten erstmals für Masseninfektionen sorgte (‚Hamburger Diseases‘ USA 1982, USA 1993, Schottland 1996).

Zur Entstehung der *EHEC*- Stämme wird horizontaler Gentransfer via Plasmiden und Bakteriophagen angenommen. Während z. B. die evolutionäre Trennung der Spezies *E. coli* und *Salmonella ssp.* vor etwa 160 Millionen Jahre stattfand, liegt die Entstehung von *EHEC* O157:H7 nur wenige Jahrzehnte zurück (29, 70). Man nimmt an, daß u.a. via Phagen die Kodierung für Toxine von *Shigella dysenteriae* auf *E. coli* O55 übertragen wurde, welcher zu einem neuen Stamm (O157:H7) mutierte (29, 69, 70, 71).

Bei *EHEC* werden das EAF- Plasmid, ein Typ- III- Sekretionsapparat und Intimin nachgewiesen. Zusätzlich können Hämolsine und Serinproteasen exprimiert werden. Als Toxine werden hitzestabiles Enterotoxin (EAST), Shiga- Like- Toxin I (SLT I = VT1= Shigatoxin I) und Shiga Like Toxin II (SLT II = VT2= Shigatoxin II) beschrieben.

E. coli O157:H7 läßt sich durch die von apathogenen *E. coli* abweichenden biochemischen Eigenschaften (fehlende Säurebildung aus Sorbitol, keine β -Glucuronidase) nachweisen. Da der überwiegende Teil der *EHEC*- Infektionen in Deutschland aber durch non- O-157-

Stämme hervorgerufen wird (20, 29, 73), besteht auch hier ein Bedarf an Verfahren, die auf dem Nachweis von Virulenzfaktoren basieren.

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung von Virulenzfaktoren enterohämorrhagischer *E. coli* (EHEC) und deren Lokalisation (29).

Tab. 2: Virulenzfaktoren enterohämorrhagischer *E. coli*

Chromosomal kodiert	Plasmid- kodiert	Bakteriophagen- kodiert
Typ- III- Sekretionssystem	Bundle forming pili (Typ 4)	Shiga- like- Toxin I und II (= Verotoxin I und II)
Intimin	Enterohämolysin	
Hitzestabiles Enterotoxin	Serinprotease	
Säure-/ Kältetoleranz	Katalase / Peroxidase	
Katalase / Peroxidase		

1.1.2.4. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

EIEC- Infektionen sind charakterisiert durch eine initiale Periode mit wässriger Diarrhoe, die in 90% der Fälle den Krankheitsverlauf abschließt. In bis zu 10% der Fälle kommt es anschließend zu einem ruhrartigen Krankheitsbild mit Blut- und Schleimabgang sowie Fieber. Der Krankheitsverlauf entspricht im wesentlichen dem einer Shigellen- Infektion. *EIEC* sind, gemeinsam mit *Shigella ssp.*, gefürchtete Erreger kindlicher Diarrhoen in Entwicklungsländern. Die Inzidenz in Industriestaaten wird bisher allgemein als niedrig eingeschätzt. Bislang ist nur der Mensch als Reservoir beschrieben, die Übertragung erfolgt mittels kontaminierten Trinkwassers, Lebensmitteln oder durch direkte Aufnahme z.B. von kindlichen Exkrementen.

Genetisch, pathogenetisch und biochemisch stehen *EIEC Shigella ssp.* sehr nahe (1). *EIEC* heben sich u.a. durch besondere biochemische Eigenschaften (Lysin- Dekarboxylase- und Lactose- negativ) von anderen *E.coli*- Pathovaren ab. Der plasmidale ‚Invasion Associated‘ Gen- Locus ist bei *Shigella ssp.* und *EIEC* identisch.

Bei schweren Infektionen kommt es zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion des Körpers, die sich als Ulzeration des Darmepithels manifestiert. Für diesen komplexen Prozess ist eine Kaskade von Mechanismen erforderlich, die u.a. verschiedene Oberflächenproteine, Aktinfilamente und sekretorische Enterotoxine für die Penetration

und Zerstörung der Kolonepithelien beinhalten. Die Infektionsmechanismen sind sowohl chromosomal als auch Plasmid- kodiert.

Als Besonderheit von *Shigella ssp.* und *EIEC* ist bekannt, daß es häufig schon bei der Passage vom Stuhl in das Nährmedium zum Verlust des Invasions- Plasmids (pInv) kommt, welches den o.g. Gen- Lokus enthält (1).

1.1.2.5. Enteroaggregative *E. coli* (*EaggEC*)

EaggEC werden, besonders in Asien, als Erreger persistierender, wässriger Durchfällen bei Kleinkindern beschrieben. Epidemiologische Daten aus westlichen Industriestaaten sind bislang wenig aussagekräftig. Reservoir der *EaggEC* ist der Mensch, die Übertragung erfolgt durch kontaminiertes Trinkwasser.

EaggEC besitzen, ähnlich den *EPEC* und *EHEC*, neben den bfp auch ein hitzestabiles Enterotoxin. Phänotypisch zeigen sie aggregative Adhärenz an Darmepithelien in der Zellkultur und zeichnen sich durch Persistenz im Wirts- Organismus aus (1,53, 54).

1.1.2.6. Diffus adhärierende *E. coli* (*DAEC*)

DAEC wurden als Erreger persistierender Brechdurchfälle beschrieben. Die Infektionswege sind allerdings nicht geklärt. Zeitlich unabhängig wurde über Endemien in Hongkong, Bangladesh, Frankreich und Mexiko berichtet (54-58). In einigen dieser Berichte wird ein Zusammenhang mit vorangehenden Harnwegsinfekten vermutet. In der Zellkultur zeigen *DAEC* eine diffuse Adhärenz an Darmepithelien (DA- Phänotyp). Sie besitzen auf dem EAF- Plasmid kodierte Virulenzfaktoren, einen Typ- III- Sekretionsapparat sowie Proteine der molekularen Spritze (57). Da diese Gruppe als genetisch heterogen beschrieben ist und nur wenige Berichte über lokales Auftreten vorliegen, wurde sie in dieser Arbeit nicht untersucht.

1.1.3. Stand der Diagnostik

Die Routinediagnostik von enteropathogenen *E. coli* beruht derzeit auf Nachweismethoden, die nicht einheitlich, kompliziert und vor allem zeitlich aufwendig sind und daher oft nur in speziellen Zentren durchgeführt werden (3).

In der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie der Charite - Campus Benjamin Franklin stehen Nachweisverfahren für *EPEC* und *EHEC* zur Verfügung (2).

EPEC können nach Anzucht von Einzelkolonien mittels biochemischer Leistungsprüfung und Agglutination mit poly- und monovalenten Seren nachgewiesen werden. Bei *EHEC* wird neben Anzucht und Agglutination von Einzelkolonien mit O:157- spezifischem Antiserum ein kommerzieller Sandwich- ELISA zum Verotoxin- Nachweis aus der Stuhlprobe und einer Anreicherungskultur genutzt (2).

ETEC, *EIEC* und *EaggEC* wurden bislang nicht routinemäßig nachgewiesen.

Die Empfehlungen der Fachgesellschaft MIQ (3) favorisieren einen Nachweis der Virulenzfaktoren mittels molekularbiologischer Methoden (DNS- Hybridisierung, PCR), allerdings gibt es dazu keine Standards.

1.1.4. Fragestellung

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten der -in der Regel- auf kulturellem und serologischen Nachweis beruhenden herkömmlichen Diagnostik sollten in der vorliegenden Arbeit die 5 relevanten Pathovaren enteropathogener *E. coli* (*ETEC*, *EPEC*, *EHEC*, *EIEC* und *EaggEC*) auf molekularer Ebene direkt aus dem Stuhl und aus Rektalabstrichen nachgewiesen werden.

Für den Nachweis auf DNA- Ebene wurde ein Multiplex- PCR- Protokoll entwickelt und an Kindern und Reiserückkehrern im Rahmen einer Querschnittsstudie getestet.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

1. Können Monoplex- PCR- Nachweise für *EHEC*, *EPEC*, *ETEC*, *EIEC* und *EaggEC* in einem Multiplex- PCR- Protokoll zusammengefügt werden?
2. Lassen sich enteropathogene *E. coli*- Stämme (*EHEC*, *EPEC*, *ETEC*, *EIEC*, *EaggEC*) mittels PCR direkt aus dem Stuhl und aus Rektalabstrichen nachweisen?
3. Ist das Multiplex- PCR- Protokoll in die Routinediagnostik eines mikrobiologischen Labors übertragbar?
4. Welche Häufigkeiten zeigen enteropathogene *E. coli* bei Kindern und Tropenrückkehrern mit Durchfällen?