

4. Diskussion

Obwohl enteropathogene *E. coli* bis zu 30% aller Durchfälle weltweit (1) auslösen, stellt der auf kulturellen Verfahren basierende Nachweis ein großes Problem dar. Somit liegen, mit Ausnahme der meldepflichtigen *EHEC*, keine genauen Erkenntnisse zur Prävalenz enteropathogener *E. coli* vor.

In der vorliegenden Studie sollte deshalb die Diagnostik enteropathogener *E. coli* auf molekularer Ebene aufgebaut werden. Dazu mußten geeignete Virulenzfaktoren gesucht, die Einzelnachweise in einer herkömmlichen Monoplex- PCR etabliert, in einem anwendungsorientierten Panel zusammengefügt und schließlich als Multiplex- PCR etabliert werden. Um einen schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweis (siehe 1.1.1. und 1.1.2.4.) der Virulenzfaktoren zu erzielen, mußte der PCR- Nachweis von Virulenzfaktoren enteropathogener *E. coli* direkt aus dem Stuhl etabliert werden. Nach Etablierung des Multiplex- Panels mußten dieses schließlich auf Routinetauglichkeit getestet werden, wozu in einer Querschnittsuntersuchung über 200 Stuhlproben von Kindern und Reiserückkehrern im Spätsommer- Herbst 2001 untersucht wurden.

4.1. Sensitivität und Spezifität

Für die Etablierung einer Multiplex- PCR zum Nachweis von 5 Pathovaren enteropathogener *E. coli* (*ETEC*, *EPEC*, *EHEC*, *EIEC*, *EaggEC*) wurden geeignete Primersequenzen aus dem Schrifttum ausgewählt (siehe 2.8.). Bei 8 von 14 (= 57 %) der ausgewählten Virulenzfaktoren gelang der Nachweis unter Bedingungen der Originalprotokolle (siehe 2.8. und 3.1.). Die hohe Sensitivität und Spezifität der Monoplex- PCR- Nachweise bestätigten sich in den in der vorliegenden Studie entwickelten Multiplex- PCR- Panels. Wegen der wechselseitigen Beeinflussung von Primern und Templates war es nicht möglich, alle Pathovaren in einem einzigen Ansatz nachzuweisen. In derartigen Ansätzen kam es zur Amplifikation nur einer Gensequenz oder zum Ausbleiben spezifischer Banden, was Ergebnissen in der Literatur entspricht (47). Aus diesem Grund wurde die Kompatibilität von Primern und Templates, wie unter 3.4. beschrieben, zunächst in Duplex- Ansätzen getestet, auf welchen dann ein System von Multiplex- Panels bis hin zur Quadruplex- PCR aufgebaut wurde. Bei der Untersuchung der Multiplex- PCR- Panel durch mit Pathovaren enteropathogener *E. coli* gespickte Proben

reagierten nur die entsprechenden Pathovaren mit spezifischen Banden. Dabei gelang der Nachweis der Virulenzfaktoren in Verdünnungsreihen gespickter Stühle bis zu 100 Erregern /g Stuhl (siehe 3.2.6.).

Von Interesse war, daß sich die genetisch eng verwandten *EIEC* und *Shigella ssp.* auch beim Nachweis des Shiga-Toxins auf DNA-Ebene identisch verhielten. Die Untersuchung unseres *EIEC*-Referenzstammes ergab darüber hinaus eine feine Agglutination mit Polyspezifischem Shigella-Antiserum II. Überraschend war auch das reproduzierbare Auftreten von unspezifischen Produkten konstanter Länge bei der Prüfung der Spezifität mittels anderer enteropathogener Bakterien, wie *Salmonella ssp.*, *Shigella ssp.*, *Vibrio ssp.* und *Campylobacter ssp.* bei einer Annealingtemperatur von 58°C (siehe 3.3.). Alle getesteten Enteritis-Salmonella-Isolate mit Ausnahme von *Salmonella Paratyphi* reagierten mit den Primern für *SLTI* mit einem Produkt gleicher Bandenlänge (etwa 310 bp). Da Homologien zwischen *EHEC*, *EPEC* und *Salmonella ssp.* z.B. in Bezug auf das EAF-Plasmid bekannt sind (46), könnte die Ursache in der genetischen Verwandtschaft der Spezies oder in durch Plasmide (z.B. bfp) und Bakteriophagen (z.B. *SLTI*, siehe 1.1. ff.) übertragenen Virulenzfaktoren liegen (29, 69). Für die Möglichkeit horizontalen Transfers von Virulenzfaktoren könnte die von uns häufig beobachtete ‚Instabilität‘ der Virulenzfaktoren sprechen, da schon eine einzige Passage häufig zum Verlust der Virulenzfaktoren führte.

Die Sensitivität der Multiplex-PCR erwies sich als ausreichend, da schon geringste Mengen von Erreger-DNS in gespickten Stühlen nachgewiesen wurden (siehe 3.2.6.). Vor dem Hintergrund der Normalflora im Stuhl (gramnegative coliforme Stäbchen: 10^8 Erreger/ g Stuhl) konnten die Virulenzfaktoren von *ETEC*, *EHEC* und *EaggEC* bis zu einer Menge von ca. 1000 Erregern/ g Stuhl nachgewiesen werden. Für *EPEC* und *EIEC* gelang der Nachweis sogar bis zu einer Menge von ca. 100 Erregern/ g Stuhl. Im Falle einer Infektion ist von einer wesentlich höheren Erregerzahl im Stuhl auszugehen, da bereits die infektiöse Dosis der Keime deutlich höher liegt (z.B. enteropathogene *E.coli*: 10^8). So wird durch den Nachweis mittels Multiplex-PCR die Diagnostik der *E. coli*-Pathovaren möglich gemacht, desweiteren erlaubt diese Methode die Erhebung genauer epidemiologischer Daten (siehe 4.3.). Dabei liegen die Nachweisgrenzen in der vorliegenden Arbeit unter denen anderer Multiplex-PCR-Studien (47).

4.2. Ergebnisse des Patienten- Screenings

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, die Prävalenzen enteropathogener *E. coli* vor allem bei Fernreiserückkehrern und Kindern mit Durchfallserkrankungen zu erheben. Deshalb wurden neben Stuhlproben von Kindern und Erwachsenen auch Rektalabstriche von Säuglingen verarbeitet. Bei der Untersuchung von über 200 Patientenproben zeigte sich, daß die Multiplex- PCR routinetauglich ist. Bis zu 28 Proben konnten gleichzeitig mittels des Routine- Panels auf alle 5 Pathovaren enteropathogener *E. coli* untersucht werden. Inklusive Aufbereitung der Proben und Auswertung mittels Elektrophorese stand das Ergebnis nach 4-5 Stunden fest.

Die Multiplex- PCR- Diagnostik wurde parallel zur konventionellen mikrobiologischen Diagnostik in den Einsender- Instituten durchgeführt. Positive Multiplex- PCR- Resultate aus Stuhlproben und Rektalabstrichen wurden in dieser Studie mittels Anzucht, PCR- Nachweis der Virulenzfaktoren aus der Kultur und Typisierung mittels biochemischer Leistungsprüfung bestätigt (siehe 3.5.1.).

Ein direkter **Vergleich der konventionellen Diagnostik mit den Ergebnissen der Multiplex- PCR- Diagnostik** war nicht möglich, da von den Einsenderinstituten der Nachweis enteropathogener *E. coli* nur bei entsprechender Fragestellung anhand von Serotypisierung (*EPEC*) und Toxinnachweis im ELISA (*EHEC*) durchgeführt wurde. Eine relativ umfangreiche konventionelle Diagnostik enteropathogener *E. coli* (Serotypisierung und ELISA- Toxinnachweis für *EHEC*) wurde nur seitens des Instituts für Laboratoriumsdiagnostik im Vivantes Netzwerk für Gesundheit Region Süd betrieben.

14 Proben von Säuglingen wurden seitens der Einsender ausschließlich einer Virusdiagnostik unterzogen. Bei diesen Proben wurden mit der Multiplex- PCR doppelt so viele *EaggEC* wie in der Gesamtgruppe der Kinder nachgewiesen. In 5 der 14 Fälle wurden Viren als Auslöser der Diarrhoe nachgewiesen, bei den verbleibenden 9 Proben gelang uns der Nachweis von *EaggEC* in 33,3% und von *EIEC* in 11.1% der Fälle, entsprechend wurden in diesen Fällen *EaggEC* 2,5 mal häufiger als in der Gruppe der Kinder und 3 mal häufiger als bei allen Patienten nachgewiesen. Virus- und *E. coli*- Pathovar- Nachweis war in keinem Fall gleichzeitig positiv. Dieses Ergebnis wurde im Grunde von uns erwartet, da aufgrund der Symptomatik einer *EaggEC*- Infektion (persistierende, wässrige Durchfälle) bei Säuglingen klinisch der Eindruck einer Rota- oder Adenovirusinfektion entstehen kann.

Mit der Multiplex- PCR wurden in insgesamt 41 Proben enteropathogene *E. coli* nachgewiesen. Davon wurden nur in drei Fällen (Labornummern 1, 160 und 215) auch von

den Einsendern enteropathogene *E. coli* detektiert. In der Probe 1 wurden seitens des Einsenders *EHEC* mittels Toxinachweis im ELISA diagnostiziert, was mit dem Nachweis von *SLT 1*- und *uidA* im Rahmen dieser Studie korrelierte. Bei der Probe 215 wurden mittels Multiplex- PCR *EaggEC* nachgewiesen, während einsenderseitig mittels Serotypisierung O86 als *EPEC* diagnostiziert wurde. Hier muß angemerkt werden, daß Stämme von O86, insbesondere O86: K61, 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 sind. Die Zuordnung dieses ausgesprochen vielgestaltigen Serovars zu einer bestimmtem Erkrankung ohne Nachweis der Virulenzfaktoren erscheint daher wenig plausibel und unterstreicht die besprochenen Grenzen der konventionellen Diagnostik. In der Probe 160 wurden mittels Multiplex- PCR- Diagnostik Virulenzfaktoren der *ETEC* (*LT H* und *St a*) und *EIEC* (*Shig ipaH*) detektiert, aber kein Virulenzfaktor von *EHEC*, während einsenderseitig mittels ELISA Verotoxin von O157 nachgewiesen wurde. Da die Sensitivität und Spezifität der PCR, wie oben beschrieben, sehr hoch sind, bleibt als Erklärung die Möglichkeit der mangelnden Spezifität des ELISA- Nachweises. Alternativ könnte eine Probenverwechslung vorgelegen haben. Weiterhin wurden in zwei aufeinanderfolgenden Proben bei der ersten Probe (Labornummer 163) mittels Multiplex- PCR *EPEC* diagnostiziert, wobei der konventionelle Nachweis weder seitens des Einsenders noch in der vorliegenden Studie gelang. Bei der zweiten Probe (Labornummer 164) wurde vom Einsender mittels serologischer Typisierung O144 als *EPEC* diagnostiziert. In diesem Fall könnte es sich um die Folge serologischer Diagnostik handeln, welche molekularbiologischen Standards nicht standhält. Eine Probenverwechslung konnte jedoch auch hier nicht ausgeschlossen werden. In einem weiteren Fall (Labornummer 104) wurden mittels Multiplex- PCR aus dem Stuhl Virulenzfaktoren von *EaggEC*, *ETEC* und *EIEC* nachgewiesen und von uns aus der Kultur *EaggEC* bestätigt, wogegen der Einsender laut Befund keine enteropathogenen Bakterien und kein Shigatoxin nachweisen konnte. Der Befund läßt auf eine Erweiterung der konventionellen Diagnostik mit serologischer Typisierung der Erreger und *Verotoxin*- Nachweis im ELISA (*Verotoxin* = *Shiga- like- toxin* = *shiga toxin*, *EHEC*) seitens des Einsenders schließen. Die Erfolglosigkeit unterstreicht die Notwendigkeit eines PCR- gestützten Nachweises enteropathogener *E. coli* in der Routine- Diagnostik.

In der vorliegenden Studie wurden mittels Multiplex- PCR- Diagnostik bei 19,3% aller untersuchten Proben enteropathogene *E. coli* nachgewiesen. Am häufigsten wurden mit 10,6% *EaggEC* nachgewiesen, gefolgt von *EIEC* mit 6,2% und *ETEC* mit 3,3%. *EHEC*

(1,4%) und *EPEC* (0,5%) wurden nur selten nachgewiesen. Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu den vom RKI erhobenen Daten zu stehen. So standen in Deutschland 2002 *EHEC* mit 0,87% an 5. Stelle aller gemeldeten bakteriellen Durchfallerreger, nach den mit 3,7% an 4. Stelle stehenden gemeldeten Infektionen durch andere enteropathogene *E. coli*, überwiegend *EPEC* (2001: 83% *EPEC*, 2002 keine Daten) (74). Dies entspricht einer Gesamtprävalenz enteropathogener *E. coli* in Deutschland 2002 von 4,57%. Diese Daten sind allerdings nicht aussagekräftig, da nur für *EHEC* seit 1998 eine Meldepflicht besteht. Zudem weist das RKI selbst darauf hin, daß die Bestimmung der Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren die einzig verlässliche Methode ist, in der Praxis jedoch der serologische Nachweis (Serotypisierung) geführt wird (74), was sich selbst in aktuellen Untersuchungen fortsetzt (80, 86). So ist die Diagnostik lediglich für *EHEC* als hinreichend sensitiv einzuschätzen (Sensitivität des ELISA- Toxin nachweises für *EHEC* aus der Anreicherung 84%, aus dem Stuhl geringer) (98). Dazu kommt, daß wässrige Durchfälle in der Regel nur auf Typhus, Paratyphus, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* und *Yersinia spp.*, bei Säuglingen eventuell auch auf *E. coli*- Serotypen oder Rota- und Adenoviren untersucht werden. Daher ist ein Vergleich der in dieser Studie erhobenen Daten mit den für Deutschland vom Robert- Koch- Institut erhobenen Prävalenzen nur begrenzt möglich. Schätzungen in der internationalen Literatur gehen bei Durchfällen durch enteropathogene *E. coli* von Prävalenzen bis zu 30% aus (1), unabhängig von den oft beobachteten lokalen Ausbrüchen („Hamburger Disease“). Diese Angaben korrelieren wesentlich deutlicher mit den in dieser Studie erhobenen Daten als mit den an das RKI Berlin (74) gemeldeten Daten. Zusammenfassend gilt auch für enteropathogene *E. coli*, daß man nur das findet, wonach man sucht.

Interessanterweise zeigten sich zwischen den 3 Patientengruppen (Fernreisende, Kinder bis 10 Jahren, Sonstige) **deutliche Unterschiede sowohl hinsichtlich der Gesamthäufigkeit enteropathogener *E. coli* als auch der Verteilung der 5 getesteten Pathovare.**

Die hier erhobene Gesamthäufigkeit von *E. coli*- Pathovaren lag bei Fernreisenden mit 26,2% aller Proben am höchsten. Demgegenüber wurden bei Proben von Kindern in 21,6% der Proben Pathovare von *E. coli* nachgewiesen. Die übrigen Patienten zeigten mit nur 6,1% positiv getesteter Proben die geringste Häufigkeit. Innerhalb der Studie wurde zu keiner Zeit eine zeitlich oder lokal begrenzte Häufung der Nachweise enteropathogener *E. coli* beobachtet, die auf einen lokalen Ausbruch hätte hindeuten können. Somit weisen die gesammelten Daten darauf hin, daß enteropathogene *E. coli* in Deutschland bei Kindern bis

10 Jahren und Fernreisenden als Durchfallerreger eine weitaus größere Rolle spielen als bislang angenommen.

Bei Kindern wurden *EaggEC* mit 12,8% aller Proben doppelt so häufig nachgewiesen wie *EIEC* (5,9%). *ETEC* machten hier 3,9% der Fälle aus. Wegen des besonderen Interesses an *EPEC* (Dyspepsie- Coli) und *EHEC* bei Säuglingen wurden Kinder unter 1 Jahr als Subgruppe genauer ausgewertet: bei insgesamt 47 Kindern unter einem Jahr wurden nur 2,1% *EPEC* gefunden, allerdings 10,5% *EaggEC*, 4,3% *ETEC*, 2,1% *EIEC* und keine *EHEC*. Hier besteht eine eklatante Diskrepanz zu den v.a. durch Serotypisierung gewonnenen und an das RKI gemeldeten Daten (Anteil der *EPEC* an allen *E. coli*- Pathovaren 2001: 67,4%, s.o.).

Bei Fernreisenden konnten *EaggEC* (11,5%) und *EIEC* (9,9%) fast gleichhäufig nachgewiesen werden. *ETEC* waren mit 3,3% vertreten. Daten internationaler Studien über *E. coli* bei Reiserückkehrern sind für *ETEC*, *EIEC* und *EaggEC* eher inkohärent. Luscher et al fanden 1994 18,5% *ETEC* sowie 19,8% *EIEC/ Shigella spp.* (51), Vargas et al fanden 1998 3,4% *EIEC*, 15,7% *ETEC* und 13,4% *EaggEC* (59). Schultsz et al fanden 2000 10,7% *ETEC* und 9,5% *EaggEC* (60), und Vila et al fanden 2001 9% *EaggEC* (97). Während in den o.g. Studien Reiserückkehrer aus allen Ländern eingeschlossen wurden, untersuchte eine japanische Studie 1999 Reiserückkehrer nur aus asiatischen Ländern und fand 13,5% *EaggEC*, ohne Untersuchung der *ETEC* (62). Auffällig ist die mit den Jahren abnehmende Tendenz des Nachweises von *ETEC* bei gleichbleibender Höhe des *EaggEC* - Nachweises, was mit dem Wandel der Diagnostik zusammenhängen kann, wobei aber ein Wechsel der tatsächlichen Prävalenzen nicht auszuschließen ist. Aktuelle Untersuchungen zeigen, daß *ETEC*- Infektionen nicht unbedingt ein Problem von Reiserückkehrern aus unterentwickelten Ländern sind, sondern eher, als Folge mangelhafter Hygiene bei Lebensmitteln und Trinkwasser, zu lokal begrenzten Ausbrüchen führen. Dies wurde für Ausbrüche auf Kreuzfahrtschiffen, in 5- Sternehotels und Restaurants gezeigt, wo häufig Eiswürfel oder Petersilie den Vektor darstellten (99, 103, 108), für Ausbrüche in Zusammenhang mit ‚Seafood‘ (Fische, Shrimps) (100, 107), für Ausbrüche in Schulen (Thunfischpaste, Japan) (100) und Kinderkrankenhäusern (Säuglingsnahrung, Indien) (101), bei Kindern in Entwicklungsländern (102, 104, 105) und Erwachsenen, die sich entsprechend lokaler Gegebenheiten vor allem von ‚ready- to- eat- meal‘ ernähren (z.B. Chili- Sauce in Mexiko) (106). So werden *ETEC* heute als eine der wichtigsten Ursachen von food- borne- diseases außerhalb der hochentwickelten Industriestaaten angesehen.

Genauere epidemiologische Daten zu Prävalenzen aller 5 Pathovaren bei den unterschiedlichen Patientengruppen sind zur Zeit in der Literatur nicht verfügbar. Ein Vergleich ist lediglich mit

Studien über einzelne bzw. wenige Pathovare, Studien, die auf serologischer Typisierung basieren (80) oder auf ausgewählten, d.h. nicht repräsentativen, Proben. Etliche Studien, in denen eine PCR- Diagnostik durchgeführt wurde, untersuchten *E. coli*- Isolate erst nach monate- bzw. jahrelanger Kultivierung (75, 77, 82). In diesen Fällen läßt sich, nach den Ergebnissen unserer Studie, nur noch eine stark eingeschränkte Aussage hinsichtlich der Virulenzfaktoren treffen. Toma et al. (75) fanden 2002 in einer japanischen Studie, in der alle Pathovare in einem Multiplex- PCR- Ansatz untersucht wurden, in 138 von 156 untersuchten Proben Pathovare enteropathogener *E. coli*. Dieses Ergebnis ist vermutlich wenig repräsentativ für die Gesamtheit der Durchfallserkrankungen, insbesondere, da die Autoren keine Angaben über Dauer der Kultivierung der Isolate und Herkunft der Proben machen. So bleibt unklar, ob es sich um Proben aus Ausbrüchen handelte. Die Möglichkeit eines Verlustes von Virulenzfaktoren durch Kultivierung wurde nicht berücksichtigt. Auch die Tatsache, daß bei 138 positiv getesteten Proben ausschließlich Mono- Infektionen beschrieben sind, läßt Fragen offen. In der vorliegenden Studie wiesen wir bei 41 positiv getesteten Proben immerhin 4 mal Doppel- oder Dreifachinfektionen nach, in jedem Fall mit Beteiligung von *EIEC* und/ oder *EaggEC*. Bereits im Vorfeld des Screenings von Patientenmaterial untersuchten wir die wechselseitige Beeinflussung von Templates in der Multiplex- PCR. Das häufigste Ergebnis beim Einsatz von Templates für *EIEC* oder *EaggEC* in Proben mit Templates mehrerer Pathovare war die Amplifikation der erstgenannten Banden bei Unterdrückung der anderen Banden (siehe 3.4.). Wir legten daher besonderen Wert auf Kompatibilität nicht nur der Primer, sondern auch der Templates in den Multiplex- PCR- Ansätzen. Leider findet sich in der japanischen Studie kein Hinweis, daß dies berücksichtigt wurde. Fotos der PCR- Untersuchung zeigen stets nur den Nachweis eines Pathovars. Insgesamt sind, bei kritischer Betrachtung, o.g. Studie leider keine Prävalenzen zu entnehmen.

ETEC werden als typischen Erregern der Reisediarrhoe 30- 50% der Durchfälle bei Reisediarrhoe zugeschrieben (1). Wir fanden *ETEC* mit einem eher geringen Anteil von 3,3% an allen Proben. Bei Kindern lag der Anteil mit 3,9% höher als bei Fernreisenden (3,3%). Die in der vorliegenden Studie gefundene Prävalenz fügt sich allerdings in die inkohärente Datenlage internationaler Studien ein. So fanden Schultz et al. (60) in einer holländischen Studie über Reiserückkehrer mittels PCR- Technik einen *ETEC*- Anteil von 10.7%. Luscher et al. (51) konnten in der Schweiz bei 18.5% der Reiserückkehrer *ETEC* nachweisen. Wie oben beschrieben, sind *ETEC*- Infektionen oft lokal begrenzte Ausbrüche, hervorgerufen durch Kontamination von Lebensmitteln, was zu den differierenden Prävalenzen führen kann.

Der Nachweis entweder nur des hitzelablen (LT) oder des hitzestabilen (ST) Toxins der *ETEC* in 3 von 7 Fällen und beider Toxine in 4 Fällen korreliert mit Daten internationaler Studien. Peruski et al fanden von 1993- 95 in einer ägyptischen Studie über *ETEC* 57% ST-positive, 34% LT- positive und 9% ST- und LT- positive Proben (77). Biswas et al. (56) fanden 1996 in einer Untersuchung von 253 Kulturoisolen aus Stuhlproben von Durchfällen bei Kindern in Hongkong 12,3% ausschließlich LT- positive *ETEC*. Da o.g. Studien den PCR- Nachweis von Virulenzfaktoren bei Kulturoisolen führten, ist hier neben einer regional unterschiedlichen Ausstattung mit Virulenzfaktoren auch deren Verlust durch Kultivierung in Betracht zu ziehen.

Die Häufigkeit von *EIEC* ist in der vorliegenden Studie höher als erwartet. Bei Fernreisenden konnte mit 9.9% eine deutlich höhere Prävalenz als bei Kindern (5.9%) und der Gesamtgruppe (6.2%) festgestellt werden. *EIEC* wurden mit einem Anteil von 37.5% an den positiv getesteten Proben am häufigsten bei Fernreisenden nachgewiesen. Ähnlich hohe Daten finden sich bei Luscher et al. (51) in einer Schweizer Studie über Reiserückkehrer, in der mittels PCR bei 19.8% der Patienten mit Durchfall und Fernreiseanamnese *EIEC* detektiert wurden. Bei mexikanischen Kindern mit Durchfall wurde für *EIEC* mittels PCR eine Prävalenz von 14.7% gefunden (52). Im Gegensatz dazu fanden Vargas et al. (59) mittels PCR- Nachweis aus Kulturoisolen nur einen *EIEC*- Anteil von 3.4% bei Reiserückkehrern. Nataro und Kaper (1) wiesen darauf hin, daß bei Infektionen mit *EIEC* die Erreger häufig als apathogene *E. coli* oder *Shigella ssp.* missdiagnostiziert werden. Der rapide Verlust der Virulenzfaktoren während der Kultivierung führt zu falsch negativen Ergebnissen auch in der PCR- Untersuchung (1), was zu der inhomogenen Studienlage beitragen dürfte.

EaggEC zeigten in allen untersuchten Patientengruppen die größte Häufigkeit. In 10,6% aller untersuchten Proben wurden *EaggEC* nachgewiesen, entsprechend in 47,6% aller positiv getesteten Proben. Bei Kindern lag der Anteil mit 12.8% aller Proben respektive 59,7% aller positiv getesteten Proben am höchsten. Die größte Häufigkeit von *EaggEC* wurde mit einem Anteil von 33,3% bei Kindern mit dem klinischen Verdacht auf eine Virusinfektion, ohne entsprechenden Virusnachweis, festgestellt. So erreicht die in dieser Studie gefundene Prävalenz von *EaggEC*- Infektionen zwar insgesamt nicht die Zahlen von Studien aus Entwicklungsländern (Prävalenzen zwischen 20 und 30 % in Indien, Iran/ Irak, Mittelamerika und Asien)(1; 53; 54), ist aber wesentlich höher als erwartet. Zur Epidemiologie von *EaggEC* liegen aufgrund der mangelhaften Diagnostik bislang nur unzureichende Daten vor. Auch die für Deutschland an das RKI gemeldeten Daten sind aus demselben Grund kritisch zu sehen, worauf das RKI ausdrücklich hinweist (74). 11.5% aller von uns untersuchten Proben

(=43,8% der positiv getesteten Proben) von Fernreisenden waren in der PCR- Untersuchung positiv für *EaggEC*. Die Prävalenz von *EaggEC* zeigte bislang vor allem geographische Unterschiede. Die Angaben für Reiserückkehrer, v.a. aus Südamerika und Asien, schwanken zwischen 4.6% und 13.5% (60, 61, 62, 97). *EaggEC* wurden in einer polnischen Studie über enteropathogene *E. coli* bei Kindern in 16,9% der Fälle gefunden, allerdings auch in 17,3% der Kontrollen (*E. coli*- Stämme von gesunden Kindern) (82). Letztgenannte Studie arbeitete allerdings nicht mit als spezifisch für *EaggEC* angesehenen Primern, sondern mit dem PCR-Nachweis des relativ unspezifischen pAA- Gens sowie mit Phänotypisierung von Kulturisolaten. Heterogenität der *EaggEC* und eingeschränkte Brauchbarkeit des pAA-Nachweises wurden bereits in Studien beschrieben (95, 96). Es wird von großer Bedeutung sein, zukünftig genauere Daten zu Prävalenzen von *EaggEC* bei unterschiedlichen Patientengruppen zu erheben.

EPEC- Infektionen spielten in der vorliegenden Studie mit einer Häufigkeit von 0,5% bei einer Gesamthäufigkeit von 19,3% *E. coli* nur eine untergeordnete Rolle. Dies spiegelt die PCR- gestützt international erhobenen Daten gut wieder. So fanden bei der Untersuchung von Reiserückkehrern Vargas et al. (59) in einer spanischen Studie 2.8% *EPEC* und Ogata et al. (62) in einer japanischen Studie 3.6% *EPEC*. Bei der Untersuchung von Kindern mit Durchfällen fanden el-Sheikh et al (89) in einer saudiarabischen Studie 3,8%, Orlandi et al (90) in einer brasilianischen Studie 2,3% *EPEC* und Ahmetagic et al (93) in einer Studie aus Bosnien- Herzegowina 4,9% *EPEC*. Bei Patienten ohne Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe fanden Keskimaki et al (91) in einer finnischen Studie 3,2% *EPEC*, Nishikawa et al (94) in einer japanischen Studie 1,9% *EPEC* und Bathiki et al (92) in einer jordanischen Studie 3,9% *EPEC*. Insgesamt zeigt sich weltweit und unabhängig von Patientengruppen ein uniformes Bild mit Prävalenzen von 2 bis 4% *EPEC* bei Durchfallserkrankungen. Damit hat der sogenannte Dyspepsie- Coli durch Einführung der PCR- Technik seinen bisherigen Stellenwert verloren. Wo der Nachweis von *EPEC* noch immer mittels Serotypisierung geführt wird, kommt es, wie vom RKI Berlin berichtet (74), zu einer artifiziellen Häufung von *EPEC*- Infektionen (*EPEC*- Anteil in Deutschland 2001: 67,4% aller gemeldeten *E. coli*- Pathovare bzw. 83% aller Pathovare außer *EHEC*).

Auch **EHEC**- Infektionen spielten in der vorliegenden Studie mit 1,4% bei einer Gesamthäufigkeit von 19,3% *E. coli* nur eine untergeordnete Rolle, was sehr gut mit den vorwiegend durch Toxinnachweis (ELISA) erhobenen und an das RKI Berlin gemeldeten Daten korreliert. Für 2002 besteht demnach eine Prävalenz gemeldeter *EHEC*- Infektionen von 0,87% (74). Diese Prävalenz widerspiegelt sich auch im internationalen Rahmen

außerhalb von Ausbrüchen. So fanden Nishikawa et al (94) in einer japanischen Studie 1,1% *EHEC* bei einer Gesamtprävalenz von 7,3% *E. coli*. El-Sheik et al (89) fanden in einer saudi-arabischen Studie über Erreger von Durchfallserkrankungen 1,9% *EHEC* bei einer Gesamtprävalenz von 13% *E. coli*. Hingegen wurde in den für Deutschland an das RKI gemeldeten Daten 2002 bei einer Gesamtprävalenz enteropathogener *E. coli* von 4,57% ein *EHEC*- Anteil von 18,8% festgestellt (74), was weniger auf eine mögliche regionale Häufung von *EHEC*- Infektionen, sondern eher auf die Meldepflicht nur für *EHEC*- Infektionen, den relativ verbreiteten *EHEC*- Toxin- Nachweis im ELISA und die begrenzten Nachweismöglichkeiten für die anderen *E. coli*- Pathovaren zurückzuführen ist. Dies wurde auch im Vergleich der PCR- Ergebnisse vorliegender Studie mit den Einsenderdiagnosen deutlich. Nur in einem Fall wurde sowohl seitens des Einsendenden Instituts mittels Toxinnachweis im ELISA (Optimum S, Merlin, Bornheim), als auch unsererseits mittels Multiplex- PCR *EHEC* nachgewiesen. Von demselben einsendenden Institut wurde in einer Probe ein *EHEC*- Stamm durch Toxinnachweis im ELISA detektiert, wobei aus derselben Probe mittels Multiplex- PCR in vorliegender Studie ausschließlich Virulenzfaktoren von *ETEC* und *EIEC* nachgewiesen wurden. Es ist nicht auszuschließen, daß die *EIEC*- Stämme mittels ihres Shiga- Toxins, welches dem Shiga- like Toxin der *EHEC* ähnlich ist, zu einem falsch- positiven Ausfall des ELISA- Toxinnachweises bei *EHEC* geführt haben (Spezifität des ELISA 98%, allerdings wurde nicht gegen *Shigella spp.* oder *EIEC* getestet) (98). Zwei weitere *EHEC* wurden in der Multiplex- PCR bei Patienten mit wässrigen Durchfällen nachgewiesen, ohne daß sie von den einsendenden Instituten detektiert wurden. Da Sensitivität und Spezifität der Multiplex- PCR, wie beschrieben, sehr hoch sind, dürfte die Ursache am ehesten in der mangelnden Sensitivität des ELISA- Toxinnachweises (84% aus der Anreicherung, bei Stuhlproben deutlich geringer) (98) liegen.

4.3. Anwendungsmöglichkeiten des Multiplex- PCR- Panels- diagnostische, medizinische und epidemiologische Relevanz

Die Multiplex- PCR zum Nachweis von enteropathogenen *E. coli* ist für den Einsatz an Stuhlproben entwickelt worden. Für die Aufreinigung der DNS wurde ein kommerzielles Kit der Firma Qiagen verwendet, das leicht zu handhaben ist und eine Stunde Zeitaufwand beansprucht. Für Rektalabstriche von Säuglingen wurde eine Methode entwickelt (Zusammenarbeit mit Dr. Küchler, Vivantes- Klinikum Neukölln), bei der die Bakterien mit PBS und Aqua tridest gewaschen wurden. Um eine Inhibition der PCR durch Stuhlbestandteile erkennen zu können, wurde für jede einzelne Probe eine interne Positivkontrolle (*rDNA16s*) im Multiplex- PCR- Ansatz mitgeführt. Da Stuhlproben in aller Regel *E. coli* enthalten, sollte durch den Nachweis von *E. coli*- rDNS die Anwesenheit von Inhibitoren ausgeschlossen werden. Wegen der wechselseitigen Beeinflussung von Templates und Primern war es nicht möglich, alle Pathovare in einem einzigen Ansatz nachzuweisen. Deshalb mußten für verschiedene Fragestellungen unterschiedliche Panel entwickelt werden. Erreger blutiger Diarrhoen z.B. können mit einem einzigen Ansatz in einer Quadruplex- PCR nachgewiesen werden. Um alle 5 Pathovare nachweisen zu können, wurde ein Routine- Panel entwickelt, das aus einer Triplex-, einer Duplex- und zwei Monoplex- PCR besteht. Dieses Panel bietet die Möglichkeit, **innerhalb von 4-5 Stunden** inklusive Aufbereitung und Elektrophorese- Lauf den Nachweis von enteropathogenen *E. coli* aus Stuhlproben, Rektalabstrichen und Kulturisolaten in der mikrobiologischen Routine zu führen.

Die **Materialkosten** für eine Stuhluntersuchung mit den 4 in dieser Studie verwendeten PCR- Ansätzen (W1, W2, C3, W3) wurde bei Verwendung des kommerziellen Aufbereitungskits mit 6 € überschlagen, bzw. 3 € bei Untersuchung von Rektalabstrichen und Kulturisolaten.

Die PCR- Diagnostik ist eine sinnvolle und notwendige Ergänzung der konventionellen Diagnostik enteropathogener *E. coli*, vor allem für *ETEC*, *EIEC* und *EaggEC*, da durch die PCR eine **Routine- Diagnostik** überhaupt erst ermöglicht wird. Besonderen Wert erhält die Multiplex- PCR- Diagnostik durch die Inhibitoren- kontrollierte Diagnostik direkt aus dem Stuhl. Wesentliche Vorteile des PCR- Nachweises aus dem Stuhl sind neben einer hohen Sensitivität, Spezifität und dem Zeitgewinn (wenige Stunden gegenüber der mindestens 48 Stunden dauernden konventionellen Diagnostik) die zuverlässige Identifikation von

Pathovaren enteropathogener *E. coli* anhand ihrer Virulenzfaktoren. Hauptproblem beim Nachweis insbesondere von *EIEC*, aber auch *ETEC* und *EPEC* ist der rapide Verlust ihrer Virulenzfaktoren in der Kultur. Bei der Passage unserer Kontrollstämme kam es regelmäßig zum Verlust eines oder mehrerer Virulenzfaktoren, dem dann mit aufwendiger Re- Passage der Originalkultur entgegengewirkt werden mußte. Während z.B. *EIEC* aus Rektalabstrichen in Selenitboullion relativ häufig nachgewiesen werden konnten, waren sie nach Passage auf ein festes Medium meist nicht mehr detektierbar. Daher ist die Diagnostik direkt aus dem Stuhl bzw. Rektalabstrichen einer Diagnostik nach kultureller Anzucht stets vorzuziehen.

Bei der Untersuchung von *EHEC* könnten Multiplex- PCR und Toxin- Nachweis mittels ELISA gleichwertig nebeneinander stehen, wobei die Multiplex- PCR eine höhere Sensitivität besitzt (100% in unserer Untersuchung gegenüber 84% und weniger im ELISA) und zusätzlich die Möglichkeit gegeben ist, Virulenzfaktoren verschiedener Genomabschnitte nachzuweisen, was bei den unterschiedlich vorhandenen Virulenzfaktoren der *ETEC*, aber auch bei *EHEC* notwendig ist.

Die hohe Sensitivität der PCR- Technik wird international bereits in Lebensmittel- und Trinkwasseruntersuchungen genutzt. Beispielsweise wurden 2000- 2002 zur Dingbarkeitmachung von Umweltverschmutzung durch Agrarkonzerne die Prävalenzen von *E. coli* O157:H7 und *Salmonella spp.* in kanadischen Gewässern erhoben, in deren unmittelbarer Nähe hohe Inzidenzen von Durchfällen aufgefallen waren. Dort konnte eine Prävalenz von 0,9% *E. coli* O157:H7 (n=1.483) im Oberflächenwasser nachgewiesen werden (87). In Taiwan wurden durch PCR- gestützte Trinkwasseruntersuchungen (47) *ETEC* und *EHEC* bis zu einer Menge von 10^2 CFU pro Ansatz nachgewiesen, wobei keine Angaben über Prävalenzen gemacht wurden. In unserer Multiplex- PCR lag die untere Nachweisgrenze bei 10^2 - 10^3 Erreger/g Stuhl. Die Multiplex- PCR kann daher effektiv zum Nachweis geringster Erregermengen in Stuhlproben, Rektalabstrichen oder Flüssigkeiten eingesetzt werden. So eröffnen sich Einsatzmöglichkeiten für diese Technik auch im Bereich Hygiene.

Mittels Multiplex- PCR ist ein schneller und effektiver Nachweis enteropathogener *E. coli* möglich. Zur Anzucht enteropathogener *E. coli* mit biochemischer Leistungsprüfung wurden hingegen mindestens 2 Subkulturen benötigt. Um einen Virulenzfaktoren produzierenden *E. coli* aus einer Mischkultur zu isolieren, wurden zahlreiche Subkulturen angefertigt. Bei 19 von 33 subkultivierten, in der Multiplex- PCR positiv getesteten Proben gelang so der

Nachweis von Virulenzfaktoren aus der Kultur. Von diesen konnte 14 mal *E. coli* isoliert, mittels biochemischer Leistungsprüfung nachgewiesen und in Reinkultur gebracht werden. Dabei zeigte sich, daß der Multiplex- PCR- Ansatz direkt aus einer Bakterien- Mischkultur im Vergleich zur konventionellen Diagnostik deutlich arbeits- und zeitsparender ist.

Im Rahmen dieser Studie wurden alle Proben mit je 4 Ansätzen auf 5 enteropathogene *E. coli* gescreent, inklusive einer Positivkontrolle (16s-rDNA in W1). Mit dem Multiplex- PCR- Ansatz konnten bis zu 4 verschiedene Virulenzfaktoren aus Stuhl, Rektalabstrichen oder aus der Kultur in einem Ansatz nachgewiesen werden. Deshalb bietet sich für den klinischen Alltag folgendes Vorgehen an: Blutige Stühle sollten mit dem **B- Panel** in einem Ansatz auf *EHEC*, *EIEC* und *Shigella spp.* getestet werden. Stühle von Kindern können mit dem C- und W3- Ansatz auf relevante Pathovare (*EHEC*, *EPEC*, *EaggEC*, *EIEC*) in 3 Ansätzen gescreent werden. Stühle von Fernreisenden sollten wegen der von uns erhobenen Prävalenzen der Pathovare enteropathogener *E. coli* mit dem W- und C3- Ansatz auf alle Pathovare getestet werden. Dieses Verfahren bietet sich auch an, um Proben parallel auf alle 5 Pathovare zu screenen. Abbildung 9 zeigt die Einzelansätze aller Primer und den von uns verwendeten Routine- Ansatz (W1-3+C3).

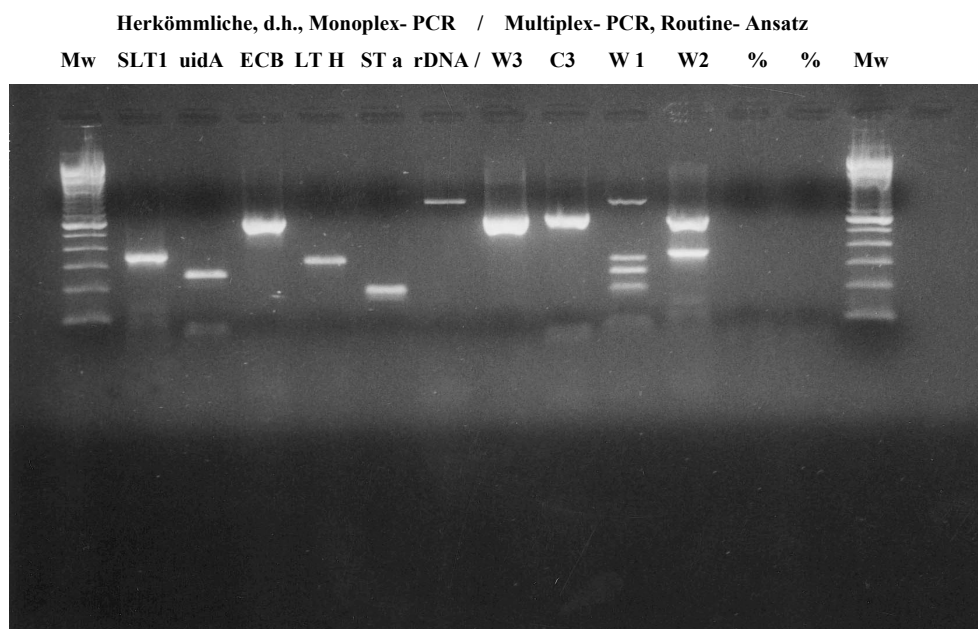


Abb. 9: Monoplex- und Multiplex- PCR: Einzelansätze und Routine- Ansatz mit W1 (ST a , uidA, LT H, rDNA16s), W2 (SLT 1, ECB), W3 (shig ipaH) und C3 (pCVD) Mw = Molekulargewichtsmarker % = Negativkontrolle

4.4. **Schlußfolgerung und Ausblick**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstreichen, daß der Einsatz einer Multiplex- PCR zum Nachweis enteropathogener *E. coli* aus Stuhlproben und Rektalabstrichen möglich ist. Die teils unerwarteten Prävalenzen enteropathogener *E. coli*, die in dieser Studie ermittelt wurden, weisen auf die überlegene Sensitivität einer PCR- gestützten Diagnostik im Vergleich zur konventionellen Diagnostik hin. Daher ist geplant, die Diagnostik enteropathogener *E. coli* mittels Multiplex- PCR in die Routinediagnostik der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie des Campus Benjamin Franklin der Charite einzuführen. Die genauen Prävalenzen von enteropathogenen *E. coli* müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden. In einer Nachfolgearbeit wird deshalb der Nachweis enteropathogener *E. coli* konsekutiv aus Stuhlproben bei Kindern mit Diarrhoe und unterschiedlichen Patientengruppen geführt. Daneben ergeben sich Einsatzmöglichkeiten für die Multiplex-PCR zum Nachweis enteropathogener *E. coli* in der Trinkwasser- und Lebensmittelhygiene.