

*e.coli*

# Geliehene Gene

Vielfalt und Evolution darmpathogener *Escherichia coli* und Herausforderungen an deren Nachweis in Lebensmitteln

PD Dr. Lothar Beutin  
Bundesinstitut für Risikobewertung,  
Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* (NRL *E. coli*)





Seit dem EHEC 0104 Ausbruch, der im Sommer 2011 in Deutschland überraschend auftrat und 4000 Menschen zum großen Teil sehr schwer erkrankten, sind durch Lebensmittel übertragbare *E. coli*-Infektionen mehr ins Bewusstsein der Menschen gerückt. Woher kommen diese Krankheitserreger und wie entstehen sie? Da harmlose *E. coli* als Bestandteil der Darmflora faktisch überall zu finden sind, steht die Diagnostik der darmpathogenen *E. coli* vor erheblichen Herausforderungen, die nur mit modernen genetischen Methoden zu bewerkstelligen sind.

Colibakterien (*Escherichia coli*) sind natürliche Darmbewohner des Menschen und der warmblütigen Tiere. Als Bestandteil der Darmflora nehmen sie vielfältige Funktionen wahr, beispielsweise bei der Stimulierung des Wirtsimmunsystems schon unmittelbar nach der Geburt. Da Colibakterien von ihren Wirten regelmäßig mit dem Kot ausgeschieden werden, gelten sie als Indikator für fäkale Verschmutzung von Wasser, Boden und nicht zuletzt von Lebensmitteln.

#### ***Escherichia coli:* ein Allroundgenie unter den Bakterien**

*Escherichia coli* ist ein Organismus mit vielen Gesichtern, der sich durch eine enorme genetische Vielfalt auszeichnet. Neben dem Basis (Core)-Genom, das für allgemeine Funktionen des Stoffwechsels und der Vermehrung der Bakterien verantwortlich und bei allen Colibakterien vorhanden ist, liegen bei den verschiedenen Vertretern dieser Bakterien zudem noch sehr unterschiedliche Determinanten als genetische Inseln im Bakterienchromosom und als extrachromosomale Elemente auf Plasmiden vor. Zusätzliche genetische Elemente können bis zu einem Drittel der gesamten genetischen Information des Bakteriums ausmachen [1]. Diese genetischen Determinanten können unter anderem auch für Virulenzeigenschaften codieren, die aus dem harmlosen Darmbewohner einen gefährlichen Krankheitserreger machen. Solche zusätzlichen Eigenschaften

Einrichtungen  
und Ausstattungen  
für Labor und  
Präparation

## Wir schaffen Lösungen



Der Spezialarbeitstisch **GrossPath GP-1500** ist die ideale Lösung für kleine Labore, die nicht an ein vorhandenes Abluftsystem angeschlossen werden können. **Liefern, Aufstellen, Anschalten:** Das neue Aktivkohle-Umluftsystem erfüllt zuverlässig alle Anforderungen an einen gesunden Arbeitsplatz.

Der **GrossPath GP-1500** ist ein Produkt aus unserer neuen **ECOLINE**-Serie.



[www.KUGEL-medical.de](http://www.KUGEL-medical.de)

**KUGEL medical  
GmbH & Co. KG**  
Hermann-Köhl-Straße 2a  
DE-93049 Regensburg

Telefon 09 41/20 86 48-0  
Telefax 09 41/20 86 48-29  
E-Mail [info@kugel-medical.de](mailto:info@kugel-medical.de)

**KUGEL**  
*medical*

# e.coli



**Lothar Beutin**, Jg. 1951, studierte Biologie an der Freien Universität (FU) Berlin. Seine Diplom- und Promotionsarbeit fertigte er am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Berlin) zur Genetik der Konjugation bei *Escherichia coli* an. Die Promotion erfolgte 1979 an der FU Berlin. Nach einem Postdoc-Aufenthalt am Institut Pasteur in Paris (1981–1982) arbeitete er am Robert Koch-Institut in Berlin auf diversen Forschungsvorhaben zu darmpathogenen *E. coli* und später als Leiter des Nationalen Referenzzentrums für *E. coli*. Seine Habilitation mit Lehrbefähigung für das Fach Mikrobiologie erfolgte 1992 am Fachbereich Veterinärmedizin an der FU Berlin. Lothar Beutin wechselte 2005 an das Bundesinstitut für Risikobewertung als Leiter des Nationalen Referenzlabors für *Escherichia coli* (NRL *E. coli*). Seine Forschungsschwerpunkte sind: Entwicklung diagnostischer Verfahren zum Nachweis von darmpathogenen *E. coli* aus Lebensmitteln und anderen Quellen. Forschung zu Toxinen und Kolonisationsfaktoren bei pathogenen *E. coli*. Charakterisierung von Bakteriophagen als Motor der Evolution von neuartigen darmpathogenen *E. coli* O104 und anderen STEC.

sind häufig „Gen-Anleihen“ aus anderen bakteriellen Spezies und aus Bakterienviren (wie beispielsweise das Shiga-Toxin-Gen übertragende Bakteriophagen bei EHEC). Diese werden in einem Prozess, der als horizontaler Gentransfer bezeichnet wird, auf die *E. coli*-Bakterien übertragen. Auf diese Weise entwickelten sich aus dem kommensalen Darmkeim *E. coli* im Verlauf der Evolution unterschiedliche Pathovaren der gleichen Spezies, die als Erreger von extraintestinalen (Harnwegsinfektionen, Sepsis, Meningitis)

und intestinalen Infektionen (Durchfall, Dysenterie) eine im Gesundheitswesen wichtige Rolle spielen.

Bei extraintestinalen Infektionen mit uropathogenen *E. coli* (UPEC) handelt es sich häufig um endogene Erreger aus der eigenen Darmflora beziehungsweise um eine Übertragung von infizierten auf nicht infizierte Menschen. Jedoch wird die Übertragung von UPEC durch Verzehr kontaminierter Lebensmittel neuerdings ernsthaft diskutiert [2]. Hervorstechendes Merkmal der extraintestinalen *E. coli* sind Eigenschaften, die es den Bakterien ermöglichen, im Wirtsorganismus außerhalb des Darmtrakts zu überleben. Hierfür muss die Immunabwehr des Wirtes blockiert werden. Naturgemäß gehören Risikopatienten aus der Gruppe der YOPI (WHO Definition für young <5 Jahre, old >65 Jahre, pregnant and immunocompromised) in erster Linie dazu. Durch Organinfektionen (Blase, Niere, Lunge) und hämatogene Streuung (Sepsis, Meningitis) können aus UPEC-Infektionen schwere lebensbedrohliche Krankheitsbilder entstehen. Ein großes Problem ist die zunehmende Resistenzentwicklung, die bei den UPEC beobachtet wird.

Bei Infektionen mit darmpathogenen *E. coli* steht die Übertragung durch kontaminierte Lebensmittel in erster Linie. Weitere wichtige Übertragungswege sind Kontakte mit infizierten Menschen und Tieren (Schmierinfektion) sowie mit einer fäkal kontaminierten Umwelt (Boden, Wasser, Gegenstände).

## Charakteristika und Typenvielfalt der darmpathogenen *E. coli*

Die Hauptschwierigkeit bei der Diagnostik von Infektionen mit darmpathogenen *E. coli* liegt darin, dass im Untersuchungsmaterial „Stuhl“ neben dem Erreger auch kommensale *E. coli* aus der natürlichen Darmflora vorliegen. Deshalb ist der Nachweis von darmpathogenen *E. coli* im Vergleich zu Salmonellen, die kein Bestandteil der natürlichen Darmflora des Menschen darstellen, wesentlich schwieriger, da er über den reinen Speziesnachweis hinausgehen muss. Zudem handelt es sich bei der Gruppe der darmpathogenen *E. coli* um ein breites Spektrum von Keimen, die verschiedene Pathogenitätsfaktoren ausprägen, sich jedoch morphologisch und in ihren Stoffwechsellleistungen kaum untereinander und von den kommensalen *E. coli* der Darmflora unterscheiden.

Ähnliche Verhältnisse liegen bei der Untersuchung von Umweltproben (Wasser, Boden) und von unerhitzten Lebensmitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs vor, die ebenfalls ein großes Gemisch an apathogenen und auch humanpathogenen Bakterien enthalten können. Aus diesem Grund müssen für die Lebensmittelüberwachung genauso wie für die Diagnostik einer Infektion bei Patienten die spezifischen Virulenzfaktoren, die Vertreter der einzelnen darmpathogenen Gruppen von *E. coli* charakterisieren, nachgewiesen werden. Mittlerweile unterscheidet man sechs Hauptgruppen darmpathogener *E. coli*, die sich durch unterschiedliche Virulenzmerkmale und Pathomechanismen auszeichnen (Tab. 1).

## Moderne genetische Nachweisverfahren

Könnte man in der vorgenomischen Ära auf der Basis der serologischen Zugehörigkeit eines *E. coli* Isolats nur Vermutungen zum Krankheitsbezug stellen, werden heutzutage Virulenzfaktoren, die hauptverantwortlich für den Krankheitsprozess sind, gezielt nachgewiesen (Tab. 1). In den letzten Jahrzehnten wurde die genetische Grundlage der Bakterien, die für ihre krankheitsauslösenden Eigenschaften verantwortlich ist, immer weiter entschlüsselt. Durch moderne Methoden der Genomsequenzierung wurde es möglich, die gesamte DNA-Sequenz eines Bakterienisolats in relativ kurzer Zeit zu ermitteln, wodurch pathogene und nichtpathogene Vertreter ein und derselben Spezies miteinander verglichen werden können. Die genetischen Abweichungen zwischen den einzelnen Vertretern von *E. coli* sind enorm. Ein apathogener *E. coli* K-12, ein EHEC und ein UPEC besitzen nur 39,2% Gemeinsamkeit auf der Ebene der von ihnen gebildeten Proteine [3].

Aus der durch die komplette Genomsequenzierung entstehenden Datenmenge (das Genom von EHEC O157:H7 umfasst 5,4 Mio. Basenpaare) müssen die diagnostisch relevanten Genabschnitte erkannt und entsprechende genetische Sonden für deren Nachweis entwickelt werden. Dies erfordert den Einsatz von leistungsfähigen Computern und ebensolcher Software, mit denen entsprechende Informationen aus einer großen Datenmenge selektiv herausgezogen werden können. Der Nachweis der Virulenzgene erfolgt entweder durch Hybridisierung (DNA-Chip-Technologie, Micro-



array-Systeme) oder durch Real-Time-PCR-Verfahren, wobei in beiden Verfahren ein zunehmender Trend zur Automatisierung stattfindet, der die Untersuchung von immer mehr Merkmalen an einer immer größeren Anzahl von Proben ermöglicht. Das ist gerade bei der Erkennung von pathogenen *E. coli* erforderlich, da häufig erst die Kombination mehrerer Merkmale in ein und demselben Bakterium von diagnostischer Bedeutung ist und im Untersuchungsmaterial überwiegend Keimgemische vorliegen. Moderne genetische Verfahren werden daher sowohl in der Lebensmitteluntersuchung als auch in der medizinischen Diagnostik zunehmend eingesetzt. Nur so kann ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, das durch die Schnelligkeit der Analyse und der Befunderhebung noch genug Zeit zur Einleitung von Präventions- und Gegenmaßnahmen lässt.

## Lebensmittelassoziierte Infektionen

### Schnelle Erkennung von Ausbrüchen am Beispiel des EHEC O104-Ausbruchs im Sommer 2011:

Die Leistungsfähigkeit moderner genetischer Methoden bei der Aufklärung von lebens-

Tab.1 Krankheitsauslösende Eigenschaften wichtigster darmpathogener *Escherichia coli* des Menschen

Pathovar	Typisches Krankheitsbild	Pathomechanismus	Diagnostisch relevante Virulenzmerkmale	Natürliches Reservoir
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Wässriger Durchfall bei Säuglingen und Kleinkindern	Anheftung an und Zerstörung der Darmzellularmukosa (Enterozyten)	<i>eae</i> (Intimin) und <i>bfpA</i> (bundle forming pili)	Infizierte Menschen, Tiere, Lebensmittel
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	Wässriger Durchfall bei Menschen aller Altersgruppen (choleraähnlich)	Anheftung an die Darmzellularmukosa und Produktion von Enterotoxinen	LT (hitze-labile) und ST (hitze-stabile Enterotoxine)	Infizierte Menschen, Wasser, Lebensmittel
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Wässriger Durchfall, Colitis, (Shigellenruhr-ähnlich), alle Altersgruppen	Anheftung und Invasion in die Zellen der Darmmukosa	<i>Inv</i> und <i>ipaH</i> (Invasivitätsgene)	Infizierte Menschen, Lebensmittel
Enter aggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	Colitis, wässriger Durchfall, lange Verläufe	Massive Adhärenz an der Darmmukosa und Enterotoxine	<i>aggR</i> und <i>aaiC</i> (Adhärenz)	Infizierte Menschen und Lebensmittel
Shiga Toxin bildende <i>E. coli</i> (STEC)	Wässriger Durchfall bei Menschen aller Altersgruppen,	Produktion von Shigatoxinen	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> und deren Varianten	Infizierte Menschen und Tiere, Lebensmittel, Umwelt
Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	Wässriger bis blutiger Durchfall, hämolytisches urämisches Syndrom (HUS)	Anheftung an die Darmzellen und Produktion von Shigatoxinen (Stx1, Stx2)	<i>stx1</i> , <i>stx2a</i> und deren Varianten, <i>eae</i> , <i>nle</i> , Adhärenzfaktoren, T3SS	Infizierte Menschen und Tiere, Lebensmittel, Umwelt

mittelasoziierten Erkrankungen wurde der breiten Öffentlichkeit erstmalig während der im Sommer 2011 grassierenden Epidemie mit EHEC O104 deutlich. Im Zeitraum von zwei Monaten erkrankten allein in Deutschland fast 4000 Menschen überwiegend sehr schwer, mehr als 800 Fälle von Nierenschäden (HUS) waren zu verzeichnen und 53 Patienten fielen der Seuche zum Opfer [4]. Durch moderne Verfahren der Genomsequenzierung konnten

die während der Epidemie isolierten EHEC O104-Erreger schnell als eine neuartige EHEC-Variante identifiziert werden, die Virulenzeigenschaften sowohl der EAEC als und der EHEC trägt und damit für eine besonders aggressive Form eines *E. coli*-Krankheitserregers steht. Eine Weltpremiere war die sehr zeitnahe Veröffentlichung von genomischen Sequenzen des Erregers im Internet, die in einer Art Schneeballeffekt eine Beschleunigung

der Untersuchungen und der Erzeugung von immer mehr erregerspezifischen Daten zufolge hatte ([http://blogs.nature.com/news/2011/06/the\\_german\\_e\\_coli\\_outbreak\\_40.html](http://blogs.nature.com/news/2011/06/the_german_e_coli_outbreak_40.html)). Somit konnten in extrem kurzer Zeit der Erreger in seinen wesentlichen pathogenetischen Eigenschaften charakterisiert und entsprechende Nachweisverfahren entwickelt und eingesetzt werden. Nicht zuletzt dadurch konnten kleinere, so genannte Satellitenaus-



## Elmasonic S 50 R

Schnellentgasung in der HPLC mit programmgesteuertem Ultraschall

- Prüfsiebreinigung
- Lösemittelentgasung
- Probenaufbereitung



Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG  
Kölpingstr. 1-7  
D-78224 Singen  
[www.elma-ultrasonic.com](http://www.elma-ultrasonic.com)



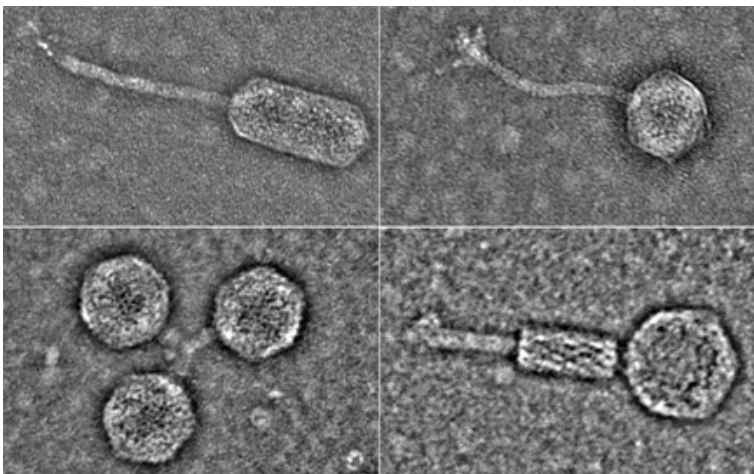
Schicken Sie einfach eine Kopie des Kaufbelegs direkt an die Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG

**Sonderaktion: Beim Kauf eines Elmasonic S 50 R in der Zeit vom 1. September bis 31. Dezember 2013 erhalten Sie 5 Liter Elma Lab Clean Konzentrat Ihrer Wahl oder ein passendes Zubehör dazu gratis.**

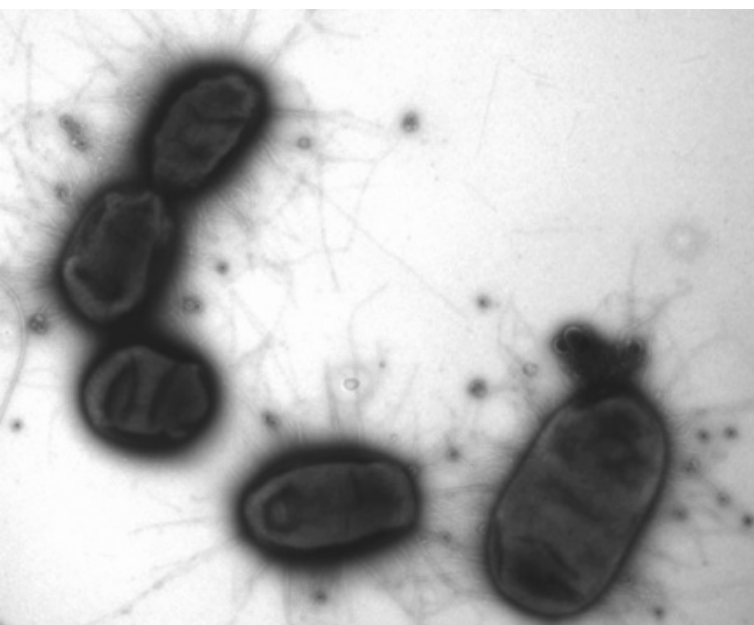
# e.coli



**Abb.1** Rinder und andere Wiederkäuer sind natürliche Träger einer enormen Vielfalt von Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC) als Bestandteil ihrer normalen Darmflora. Nicht alle STEC aus den Tieren sind humanpathogen, aber STEC können auch als Quelle von neuartigen Stx-Phagen dienen, die in der Lage sind neue bakterielle Wirte zu befallen und neuartige Krankheitserreger entstehen zu lassen.



**Abb.2** Typenvielfalt bei *E. coli* Bakteriophagen, von denen manche auch Stx-Gene tragen und übertragen können. *Aufnahme Dr. Jochen Reetz, BfR*



**Abb.3** Infektion eines Stx-negativen *E. coli* mit Stx2-Phagen. Das Ergebnis kann die Entstehung eines neuartigen Krankheitserregers sein. *Aufnahme Dr. Jochen Reetz, BfR*

brüche, die in mehreren Teilen Deutschlands und in Frankreich stattfanden, als solche schnell erkannt werden.

## Neuartige Krankheitserreger

### Molekulare Untersuchungen zur Epidemiologie und zur Entstehung am Beispiel von EHEC O104:

Die vorliegenden genetischen Informationen über den EHEC O104:H4-Erreger leisteten gute Dienste bei der Aufklärung von Infektketten (Vergleich der Ähnlichkeit auf genomischer Ebene). Aus den Untersuchungen ergaben sich enge Gemeinsamkeiten zwischen EHEC O104:H4-Stämmen aus Patienten, die bereits im Jahre 2001 in Deutschland, 2006 in Norwegen und 2009 in Georgien isoliert worden waren, mit dem 2011 in Deutschland erneut auftretenden Typ [5, 6]. Veränderungen bei den Isolaten betrafen hauptsächlich Plasmide als extrachromosomale Elemente, die für Enterotoxinbildung, Resistenz gegen Antibiotika und bakterielle Anheftungsfaktoren (Fimbrien) stehen. Epidemiologische Untersuchungen an EHEC O104:H4-Stämmen, die 2011 in Deutschland und Frankreich isoliert worden waren, deuteten auf eine gemeinsame Herkunft aus in Ägypten produzierten Bockshornkleeisamen, die für die Sprossenproduktion in Deutschland und Frankreich eingesetzt worden waren (EFSA). Allerdings konnten aus keiner der untersuchten Samenchargen EHEC isoliert werden. Frühere Untersuchungen über das Vorkommen von EHEC O104:H4 wiesen auf einen möglichen Ursprung dieser Erreger in Zentralafrika.

Untersuchungen aus dem Labor des Verfassers konnten zeigen, dass die bei EHEC O104:H4 vorkommenden Shiga-Toxin 2 (Stx2)-Phagenvariante ungewöhnliche Eigenschaften aufweist [7]. Eben diese Stx2-Phagenvariante wurde bei STEC aus Rindern in Deutschland gefunden und konnte experimentell auf EAEC O104:H4-Stämme übertragen werden (Abb. 1–3). Somit wurde das zuvor postulierte Entstehen der hochvirulenten EHEC O104-Erreger durch Phagentransduktion auch experimentell bestätigt. Epidemien durch neuartige, hochpathogene *E. coli*-Stämme wie EHEC O104 müssen daher nicht zwingend von außen eingeschleppt werden, sondern sind aufgrund des endemischen Vorkommens der Erreger beziehungsweise der entsprechenden Stx2-Phagen und deren Wirtsstämme auch in Deutschland und Europa möglich.

→ [lothar.beutin@bfr.bund.de](mailto:lothar.beutin@bfr.bund.de)

#### Literatur

- [1] Hayashi, T. et al. (2001), *DNA Res.* 2001 Feb 28; 8(1), 11–22
- [2] Nordstrom, L. et al. (2013), *Front Microbiol.*, Epub 2013 Mar 6
- [3] Kaper, J.B. et al. (2004), *Nat Rev Microbiol.*, 2004 Feb; 2(2), 123–40
- [4] Robert Koch-Institut, *Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch in Deutschland 2011*, Robert Koch-Institut, September 2011 Im Internet verfügbar unter [www.rki.de](http://www.rki.de)
- [5] Miko, A. et al. (2013), *Int J Med Microbiol.*, 2013 May 28
- [6] Ahmed, S. et al. (2012), *PLoS One*, 7(11)
- [7] Beutin L., et al. (2012), *J Virol.* Oct; 86 (19), 10444–55

Foto: © istockphoto.com | Ivan Mateev

#### Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Jochen Reetz für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 2+3) sowie Herr Friedmann-Marohn für die fotografische Gestaltung des Autorenporträts.