

Auffälliger Anstieg der Meldezahlen enterohämorrhagischer E.coli-Infektionen über die letzten Monate in der Schweiz: Einfluss neuer Multiplex PCR-Methoden in der Primär-Diagnostik?

(Datenstand 05.11.2015)

Während die meisten *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme apathogen sind, können bestimmte Stammvarianten zum Teil schwere intestinale oder extraintestinale Krankheiten auslösen. Darnpathogene *E. coli* werden zurzeit in 8 Gruppen eingeteilt (EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, DAEC, EDTEC, NTEC, STEC), wobei den Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC), synonym Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) oder - wenn es sich um humanklinische Isolate handelt - Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) aus lebensmittelhygienischer Sicht eine ganz spezielle Bedeutung zukommt. STEC wurden 1982 in den USA erstmals als «emerging foodborne pathogen» beschrieben und führten seither auch in europäischen Ländern zu lebensmittelbedingten Ausbrüchen oder sporadischen Einzelerkrankungen.

Neben der Produktion eines oder mehrerer phagencodierter Shigatoxine (Stx; Stx1 Gruppe; Stx2 Gruppe) sind für STEC eine ganze Reihe weiterer virulenzassoziierter und pathogenitätssteigernder Faktoren (z.B. Intimin: *eae* Gen; Enterohaemolysin: *ehxA* Gen) beschrieben. STEC-Stämme können wie alle *E. coli* Stämme Serotypen zugeteilt werden. Die Einteilung der Serotypen erfolgt nach einem Antigeneschema, das auf dem O-Antigen (Oberflächenantigene O1-O186), und dem H-Antigen (Geisselantigene H1-H56) beruht.

Klinik

STEC können beim Menschen von symptomlosem Trägertum, zu Gastroenteritis mit wässriger bis hämorrhagischer Diarrhöe sowie in schweren Fällen zu hämorrhagischer Colitis (HC) führen. Zudem kann als lebensbedrohliche Folge, vor allem bei Kindern unter fünf Jahren, ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) auftreten. Mit Ausnahme der Oedemtoxinvariante (Stx2e), binden Shigatoxine an Globotriaosylceramid (Gb3)-Rezeptoren auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen. Stx2e dagegen bindet an Globotetraosylceramid (Gb4) Rezeptoren. Hohe Gehalte an Gb3-Rezeptoren befinden sich vor allem in der Niere, speziell in der Nierenrinde, dort wo primär auch die Organläsionen bei HUS auftreten.

Fibrin wird in der Glomerula-Blutversorgung abgelagert, was zu einem verminderten Blutfluss zur Niere und in der Folge zur Niereninsuffizienz führen kann. Thrombo-embolische Läsionen werden auch in der Mikroblutversorgung des Hirns und des Pankreas gefunden.

Klinische Isolate

STEC-Stämme, die Infektionen beim Menschen verursachen, gehören zu einer grossen, stetig wachsenden Zahl von O:H-Serotypen. Die meisten Ausbrüche und sporadischen Fälle von HC und HUS wurden, insbesondere in den USA, Kanada und Japan, mit dem Serotyp O157:H7 assoziiert. Allerdings sind ebenso schwerwiegende humane Erkrankungen, insbesondere in Europa, Australien und Südamerika, in Assoziation mit non-O157 STEC, wie z. B. O26:H11,H-, O103:H2 oder O145:H-beschrieben. Zur Beurteilung der Pathogenität der Stämme für den Menschen ist es notwendig, neben dem Serotyp, die Shigatoxin-Gene (*stx1* Gruppe; *stx2* Gruppe) sowie weitere Virulenzfaktoren (z.B. Intimin: *eae* Gen; Enterohaemolysin: *ehxA* Gen) von isolierten Stämmen zu bestimmen. Von Patienten mit schwerwiegenden Symptomen isolierte O157 und non-O157 STEC-Stämme zeigen oft ein typisches Virulenzspektrum, wobei solche Stämme in der Regel *stx2*-Subtyp und *eae*-positiv sind. Es ist allerdings wichtig, dass das Virulenzfaktoren-Profil bei isolierten STEC Stämmen erhoben wird, da PCR Produkte aus Mischkulturen oder Originalproben keinerlei Aussagen über die Zuordnung der einzelnen gefundenen Faktoren zu spezifischen Bakterienstämmen erlauben.

Situation in der Schweiz in der Vergangenheit

Der Nachweis von EHEC beim Menschen ist in der Schweiz seit 1999 meldepflichtig. EHEC werden am Nationalen Referenzzentrum für enteropathogene Bakterien und Listerien (NENT) subtypisiert. Die EHEC Meldungen sind über die letzten Jahre relativ stabil (Abbildung 1). Ein leichter Anstieg der Meldezahlen wurde einzig im Jahre 2011, assoziiert mit dem grossen O104:H4 Sprossenausbruch in Deutschland,

registriert. Dabei handelte es sich nicht primär um ausbruchs-assoziierte Fälle in der Schweiz, sondern vielmehr um eine massive Sensibilisierung der Ärzteschaft, was zu mehr Untersuchungen geführt hat.

Zwei Arbeiten, welche die klinischen Isolate weitergehend charakterisierten, die in der Zeitspanne von 2000 bis 2009 am NENT isoliert worden waren (Käppeli et al. 2011a; Käppeli et al. 2011b), zeigten, dass in der Vergangenheit in der Schweiz O157:H7 gefolgt von O26:H11/H-, O103:H2, O121:H19 und O145:H28/H- die häufigsten STEC Serotypen darstellten, und dass aufgrund der weitergehenden Genotypisierungsergebnisse der Stämme überwiegend von sporadischen Einzelfällen und nicht von Ausbrüchen auszugehen war.

Gemeldete Fallzahlen 2015

Im Jahre 2015 wird ein sprunghafter Anstieg der EHEC Melderaten sichtbar (Abbildung 1). Seit Januar bis zum 30.10.2015 wurden im Vergleich zum Vorjahr im gleichen Zeitraum 2.5 mal mehr Fälle pro 100'000 Einwohner gemeldet. Die Zunahme betrifft insbesondere Kinder unter fünf Jahren. Doch ist die Zunahme der altersspezifischen Melderaten in allen Altersgruppen sichtbar (Abbildung 2). Im Vergleich zum Vorjahr sind etwas mehr Männer als Frauen (1.3 zu 1.1) betroffen. Zudem fand die Exposition vorwiegend in der Schweiz statt, was in früheren Jahren nicht so deutlich sichtbar war. Die Fälle sind homogen über die Schweiz verteilt ohne ersichtliche lokale Häufungen. Die Melderate von HUS ist hingegen konstant geblieben.

Gründe für die Zunahme der EHEC Meldungen

Im NENT wurde 2015 ebenfalls eine deutliche Zunahme der Nachweise von STEC festgestellt. Jedoch müssen die Erfahrungen des NENT differenziert betrachtet werden. Das NENT bietet zugunsten von klinisch mikrobiologischen Labors seit 2006 Primärdiagnostik für fünf Pathovaren von darnpathogenen *E. coli* an: EPEC, ETEC, EIEC, EAEC und STEC. Bei den Labors, welche die NENT Primärdiagnostik seit langem in Anspruch nehmen, verzeichnete das

NENT keinen oder nur einen marginalen Anstieg im Vergleich zu den Vorjahren, wobei kleine Anstiege wohl den überdurchschnittlich hohen Temperaturen des Sommers 2015 geschuldet sind, ein Effekt, der schon im Hitzesommer 2003 aufgefallen war. Die Häufigkeit aller fünf Pathovaren ist wie bei allen bakteriellen Diarrhöerregern in den Sommermonaten erheblich höher als in den kälteren Jahreszeiten. Sowohl 2003 als auch 2015 handelte es sich jedoch nicht um Ausbrüche, sondern um Zunahmen von sporadischen Einzelfällen. Dies kann mit Sicherheit festgehalten werden, weil keine Häufungen von Stämmen mit identischen Virulenzfaktor-Profilen festgestellt wurden. Die Sommerhitze 2015 z. B. assoziiert mit häufigerem Baden in Oberflächengewässern, was als Risikofaktor für die Häufung der HUS Fälle im Hitzesommer 2003 gefunden wurde, ist also vermutlich ein Grund für einen Teil der zusätzlichen Fälle.

Ein weiterer Grund ist in einer technischen Entwicklung zu suchen. Früher wurden diese Fälle nicht gemeldet, weil man nicht nach ihnen gesucht hat. Es handelt sich somit nicht um ein Meldeartefakt, sondern um eine Zunahme der entdeckten und somit gemeldeten Fälle. 2014 kamen mindestens drei auf teilweise oder voll automatisierten multiplex-PCR Ansätzen beruhenden Systeme auf den Markt, welche bis zu 15 verschiedene bakterielle, virale und parasitäre Diarrhöerregere auf einmal und sogar kulturunabhängig aus originalen Patientenproben, z. B. aus Stuhl, nachweisen können. Nebst anderen zu erwähnen sind die Systeme BD MAX Enteric Panel (BD Diagnostics, Sparks, MD), Luminex xTAG Gastrointestinal Panel (Luminex Corporation, Austin, TX) und BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel (BioFire Diagnostics, LLC, Salt Lake City, Utah, USA), von denen mindestens zwei in der Schweiz schon recht breit angewendet oder mindestens erprobt werden. Da wissenschaftliche Studien für diese Systeme im Vergleich zu klassischen kultur-basierten Methoden wiederholt höhere Detektionssensitivitäten beanspruchen, erstaunt es nicht, dass die entsprechenden Inzidenzen ansteigen, umso mehr als die für die Probenverar-

Abbildung 1:

Meldungen von EHEC und HUS in der Schweiz, 1999 bis 2015 (jeweils Fälle vom 1. Januar bis 30. Oktober eingeschlossen)

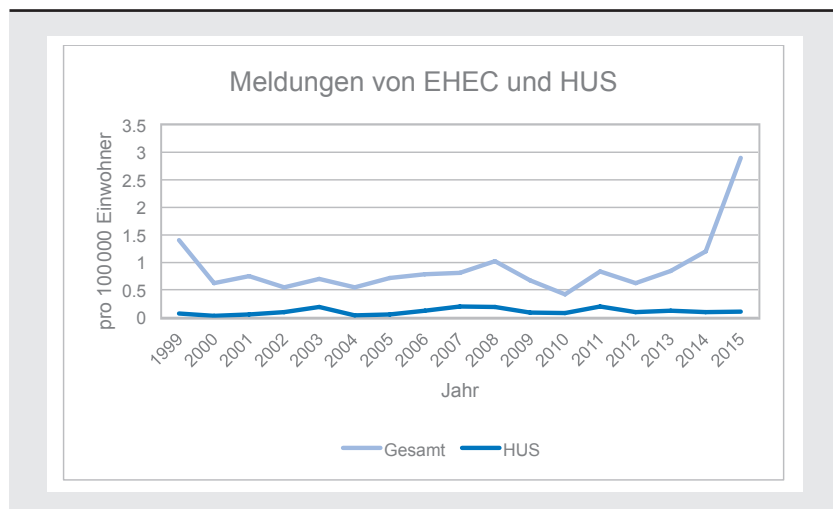
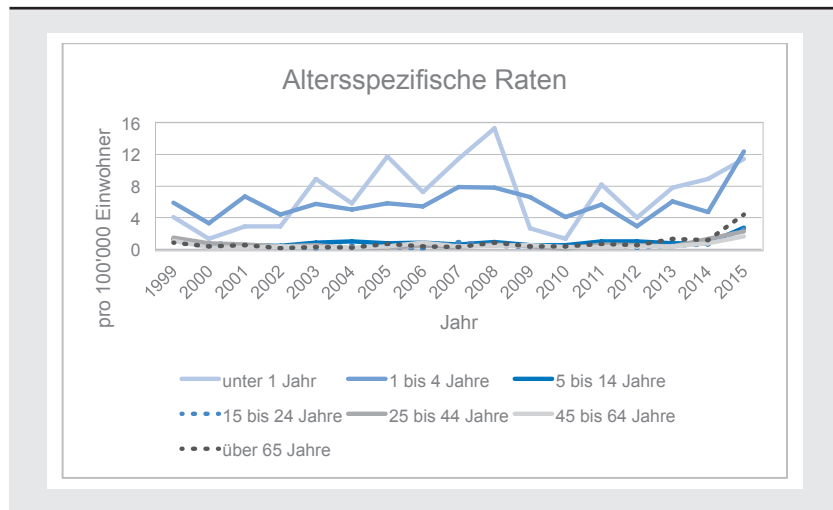


Abbildung 2:

Altersspezifische Raten von EHEC in der Schweiz, 1999 bis 2015 (jeweils Fälle vom 1. Januar bis 30. Oktober eingeschlossen)



beitung benötigte Zeit gegenüber kulturellen Methoden massiv verkürzt wird unzweifelhaft ein wesentlicher Vorteil. Aufgrund des breiten Erregerspektrums, das durch die multiplex-PCR Systeme abgedeckt wird, würde man neben den STEC (stx Gennachweis) grundsätzlich einen generellen Anstieg bei allen Diarrhöe-Erregern erwarten, mindestens aber bei den ebenfalls meldepflichtigen Campylobacter, Salmonellen und Shigellen. Dass dies nicht der Fall ist, hängt damit zusammen, dass

vorerst noch genügend kulturbasierte Infrastruktur und Knowhow vorhanden sind, um die PCR Resultate durch nachfolgende Stammisolierung zu bestätigen. Da ca 8% der Menschen symptomlose Träger von low pathogenic STEC sind (Stephan et al. 1999), führt eine routinemässige Testung von Stuhlproben mittels multiplex-PCR Systemen per se schon zu einem deutlichen Anstieg von stx PCR positiven Ergebnissen. Bei den STEC herrscht zudem hinsichtlich der Resultatinterpretation Verunsicherung, da dort die häufig

schwierige kulturelle Isolation von STEC Stämmen und anderen darm-pathogenen *E. coli* normalerweise an ganz wenige Zentren – darunter das NENT – ausgelagert wird. Diese Zusammenhänge sind im NENT seit ca. November 2014 deutlich spürbar, sowohl durch stark vermehrten Eingang von Bestätigungsproben als auch durch Anfragen und Auskunftsbegehren.

Negative Auswirkungen auf die Epidemiologie lebensmittelübertragener Erreger

Obwohl den neuen multiplex-PCR Verfahren verlockende Vorteile hinsichtlich Rationalisierung und zeitlicher Verkürzung der Diagnostik attestiert werden müssen, muss hier auch ein gewichtiger Nachteil aufgezeigt werden. Die Epidemiologie lebensmittelübertragener Erreger hat in den letzten beiden Jahrzehnten mit der Einführung von molekulargenetischen Typisierungsmethoden einen ungeahnten Boom erlebt. Sie hat zudem dank dem flankierenden Aufbau von internationalen Netzwerken wie PulseNet sowie effizienten Alarmsystemen wie RASFF etc. zur raschen und wissenschaftlich gesicherten Identifizierung von Erregerquellen geführt. So konnte die Sicherheit von Lebensmitteln trotz immer weiter zunehmendem internationalem Handel gesteigert werden. Zudem sind Bestrebungen im Gange, die Präzision der Ausbruchsklon Erkennung weiter zu steigern, z. B. durch den projektierten Ersatz von etablierten Genotypisierungs-Methoden wie der PFGE (Pulsed Field Gel Elektrophorese) mit Whole-Genome-Sequencing Ansätzen, welche dann in Sachen Diskrimination nicht mehr zu überbieten sein werden.

Die epidemiologischen Ausbruchsuntersuchungen basieren auf der Isolierung von Erregern. Multiplex-PCR Verfahren sind kultur-unabhängig und gefährden deshalb immanent die kulturabhängige Bestätigung des epidemiologischen Zusammenhangs von Fällen und Lebensmitteln. Sollten erstere also die Kultur auch nur teilweise verdrängen, dann wäre die Aufklärung von Ausbrüchen sehr stark eingeschränkt bis unmöglich. Da dies unter allen Umständen verhindert werden muss, ist es wichtig insbesondere im Fall von vermuteten

Ausbrüchen Proben für die Keimisolierung an das Nationale Referenzzentrum (NENT) einzusenden.

Mitgeteilt durch Herbert Hächler, Roger Stephan, Nationales Referenzzentrum für enteropathogene Bakterien und Listerien (NENT)

Kontakt

Bundesamt für Gesundheit
Abteilung Übertragbare Krankheiten
Telefon: 058 463 87 06
epi@bag.admin.ch

Literatur:

Käppeli U, Hächler H, Giezendanner N, Beutin L, Stephan R. Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011 Feb;17(2):180-5. doi: 10.3201/eid1702.100909

Käppeli U, Hächler H, Giezendanner N, Cheasty T, Stephan R. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with human infections in Switzerland, 2000-2009. *Epidemiol Infect.* 2011 Jul;139(7):1097-104.

Stephan R, Untermann F. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1570-2.