

Ausbreitung von *E. coli* / EHEC O104:H4 stx 2 positiven Bakterien über Kläranlagen und Einschätzung des Infektionsrisikos für Badende

Dr. Ernst-August Heinemeyer ¹⁾

Dr. Katrin Luden ¹⁾

Dr. Masyar Monazahian ²⁾

¹⁾Niedersächsisches Landesgesundheitsamt Standort Aurich, Lüchtenburger Weg 24, 26603 Aurich

²⁾Niedersächsisches Landesgesundheitsamt Standort Hannover, Roesebeckstr. 4-6, 30449 Hannover

(November 2012)

Einleitung und Zielstellung

Im Frühjahr/Sommer 2011 traf eine Durchfallepidemie mit einem ungewöhnlichen EHEC Erreger Deutschland. Besonders Norddeutschland war betroffen (1, 2, 3) und die Erkrankten litten überdurchschnittlich häufig an der schweren Verlaufsform eines hämolytisch-uräemischen Syndroms (HUS). Als Auslöser wurde *E. coli* O104:H4 identifiziert, der Shiga-Toxin-2 (stx2) produzierte (4). Bereits früh hatte sich herausgestellt, dass der Stamm gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation resistent ist und deshalb auf ESBL-Agar (Agar mit Zusatz von Cefotaxim und Ceftazidim) wachsen kann (2). Es wurde deutlich, dass dieser Stamm nicht durch Tiere oder Tierfäkalien verbreitet wurde, sondern in erster Linie durch den infizierten Menschen bzw. kontaminierte Lebensmittel. Somit wären Badegewässer, die durch Kläranlagenabläufe kontaminiert sein können, eine denkbare Infektionsquelle (5, 6). Möglicherweise betroffen wären Badegebiete besonders an der niedersächsischen Nordseeküste in deren Einzugsgebiet eine hohe Anzahl Erkrankter auftrat.

Eine Routine-Untersuchung der Badegewässer auf diese Bakterien erschien nicht realistisch und hätte bei sehr hohem Aufwand doch nur Momentaufnahmecharakter. Gleichzeitig stellte sich die Frage, ob aus Messwerten der Routineüberwachung auf *E. coli* (7) eine Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit des Ausbruchstammes abgeleitet werden kann.

Deshalb sollten durch gezielte Abwasseruntersuchungen Erkenntnisse zum Mengenverhältnis „gewöhnlicher *E. coli* : Ausbruchstamm“ gewonnen werden. In Niedersachsen wiesen die Landkreise Cuxhaven und Stade eine besonders hohe Anzahl an EHEC und HUS erkrankten Einwohnern auf (3). Insofern lag die Vermutung nahe, dass im Abwasser der dortigen Kläranlagen die gesuchten EHEC Bakterien anzutreffen sein könnten. Die Kläranlage Cuxhaven beeinflusst direkt Küstengewässer, die Kläranlage in Stade die Elbe mit Badestellen im Übergangsbereich zur Nordsee.

Ziel war, durch Ermittlung der Abwasserbelastung mit *E. coli* und dem EHEC Ausbruchstamm eine Risikoabschätzung vornehmen zu können. Es sollte abgeschätzt werden, ob der niedersächsische Grenzwert von 1.800 *E.coli* / 100 ml Oberflächenwasser einen ausreichenden Schutz vor Infektionen mit dem Ausbruchstamm bietet.

Untersuchungen und mikrobiologische Nachweisverfahren

Der Ausbruchstamm reagiert im Gegensatz zu anderen EHEC-Erregern wie z.B. O157 im Untersuchungsverfahren für die Routineüberwachung von *E. coli* in Badegewässern nach DIN EN ISO 9308-3 (8) wie ein gewöhnlicher *E. coli*. Zusätzlich besitzt er eine bereits erwähnte ESBL-Resistenz. Auf ESBL-Agar wachsende blaue Kolonien können mit *E. coli* gleich gesetzt werden. Da es kein Standardverfahren zum Nachweis speziell des Ausbruchstammes gab, wurde das Verfahren nach DIN EN ISO 9308-3 sowie ein Membranfiltrationsverfahren mit ESBL Agar mit einer abschließenden molekularbiologischen Untersuchung kombiniert.

Bestimmung der Gesamtbelastung mit E. coli im Abwasser nach DIN EN ISO 9308-3

Gemäß DIN EN ISO 9308-3 wurden die Proben in mehreren Schritten verdünnt und die unterschiedlichen Verdünnungen jeder Probe in die 96 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Jede Vertiefung ist mit einem spezifischen Substrat versetzt, von dem anwesende bzw. wachsende *E. coli* während der Inkubationszeit von 36 Stunden bei 44 °C ein fluoreszierendes Spaltprodukt freisetzen. Über ein statistisches Verfahren wird aus der Anzahl der fluoreszierenden Vertiefungen die höchst-wahrscheinliche *E. coli* Anzahl (most-probable-number, MPN) in der Ausgangsprobe berechnet.

Aus dem Ablauf der Kläranlage Cuxhaven wurden 4 Proben in je 60 Minuten Abstand entnommen (27. Juni 2011, 6:00, 7:00, 8:00 und 9:00 Uhr). Aus dem Ablauf der Kläranlage Stade wurden am 28. Juni 2011 um 7.00 Uhr, 15.00 Uhr und 24.00 Uhr Proben genommen. Da die Höhe der Gesamtbelastung mit *E. coli* Bakterien nicht bekannt war, wurden von jeder Probe drei Ansätze mit den folgenden Verdünnungsstufen angelegt:

Ansatz	A	1:2; 1:20, 1:200, 1:2.000, 1:20.000, 1:200.000
	B	1:2; 1:20, 1:200, 1:2.000
	C	1:2; 1:20

Es wurden aus allen fluoreszierenden Vertiefungen der Ansätze B Subkulturen auf ESBL Agar angelegt. Der verwendete ESBL Agar enthält Cefotaxim und Ceftazidim, Cephalosporine der sogenannten dritten Generation (9). Da der Ausbruchstamm im Gegensatz zu den meisten normalen *E. coli* Stämmen gegen diese Antibiotika resistent ist, kann so geprüft werden, ob neben dem üblichen *E. coli* auch evtl. ein EHEC O104:H4-Stamm gewachsen ist. Alle blauen Kolonien auf ESBL-Agar mit einem Durchmesser von 1-3 mm (n=76) wurden als verdächtig für den Ausbruchstamm angesehen (9) und weitergehend molekularbiologisch geprüft.

Membranfiltration

Neben der Bestimmung nach DIN EN ISO 9308-3 wurden von allen Proben 10 ml und 1 ml durch Membranen filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm, Cellulose-Mischester) und auf ESBL-Platten bebrütet (24 h, 36 °C). Dieses ermöglicht, die gesuchten EHEC Bakterien sozusagen in einem Schritt zu erfassen und nicht den Umweg über die Anreicherung im Verfahren nach DIN EN ISO 9308-3 gehen zu müssen. Nachteilig hierbei ist die oft störende Begleitflora aus anderen resistenten Bakterien wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*.

Es wurden von 2 der 7 Proben alle verdächtigen Kolonien (blau, Durchmesser 1-3 mm) des 10 ml Ansatzes und von den übrigen 5 Proben jeweils genau ¼ der verdächtigen Kolonien weiter molekularbiologisch geprüft (s. Tab. 4). Diese Beschränkung erfolgte aufgrund begrenzter Mittel.

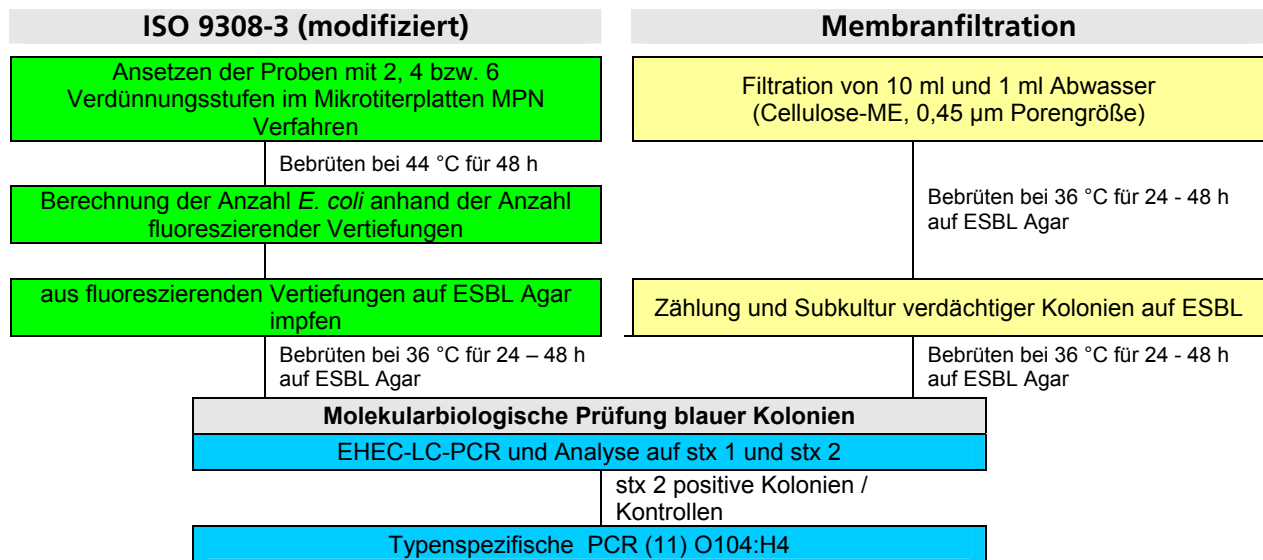


Abb. 1
Untersuchungsgang für die Abwasserproben der Kläranlagen in Cuxhaven und Stade

Monitoring von Badegewässern auf EHEC O104:H4

Badegewässerproben wurden in gleicher Weise wie die Kläranlagenproben mit dem Verfahren nach DIN EN ISO 9308-3 auf *E. coli* untersucht (7). Ab 30. Mai bis zum 13. Juli wurden die Badegewässerproben (n=791, Tab. 6) aus Nordwestdeutschland zusätzlich zur Routineüberwachung in einer umfangreichen Stichprobe auf EHEC O104:H4 geprüft. Hierzu wurden aus den Reaktionsansätzen aller Proben, die *E. coli* enthielten, üblicherweise aus 4 fluoreszierenden Vertiefungen auf ESBL-Agar-Platten abgeimpft. Wenn weniger Vertiefungen positiv waren, wurden alle Vertiefungen abgeimpft. Insgesamt wurde von 550 *E. coli* positiven Proben aus 3514 fluoreszierenden Vertiefungen 1200 *E. coli* – Subkulturen auf ESBL Platten angelegt (Tab. 6). Für alle verdächtigen Subkulturen wurde die molekularebiologische Untersuchung durchgeführt.

Molekularbiologische Verfahren:

*Bestimmung der Anzahl *E. coli* O104:H4, stx2 und Tellur D (terD)*

Für die Erregerdiagnostik ist das wichtigste Merkmal der Nachweis der Toxinbildung bzw. der Toxin-Gen-Differenzierung. Verdächtige Kolonien wurden über Nacht bei 37°C in einer Anreicherungskultur kultiviert und anschließend im Rahmen der Routine-EHEC Diagnostik in der LightCycler PCR auf stx 1 und stx2 untersucht (10).

Positive Shiga-Toxin Isolate wurden zur spezifischen Differenzierung des Ausbruchsstammes O104:H4 mittels PCR nach Karch (4) im 2%igen Agarose-Gel weiter überprüft. Alle vier Gene sollten durch entsprechende Banden in der PCR mit der entsprechenden Größe (O104rfb -351 Basenpaare (bp), flic H4 – 201 bp, stx2 – 584 bp, Tellur D – 434 bp) nachweisbar sein (4). Nur beim Nachweis aller vier Gen-Amplifikate (Abb. 2) ist der Ausbruchstamm O104:H4 bestätigt.

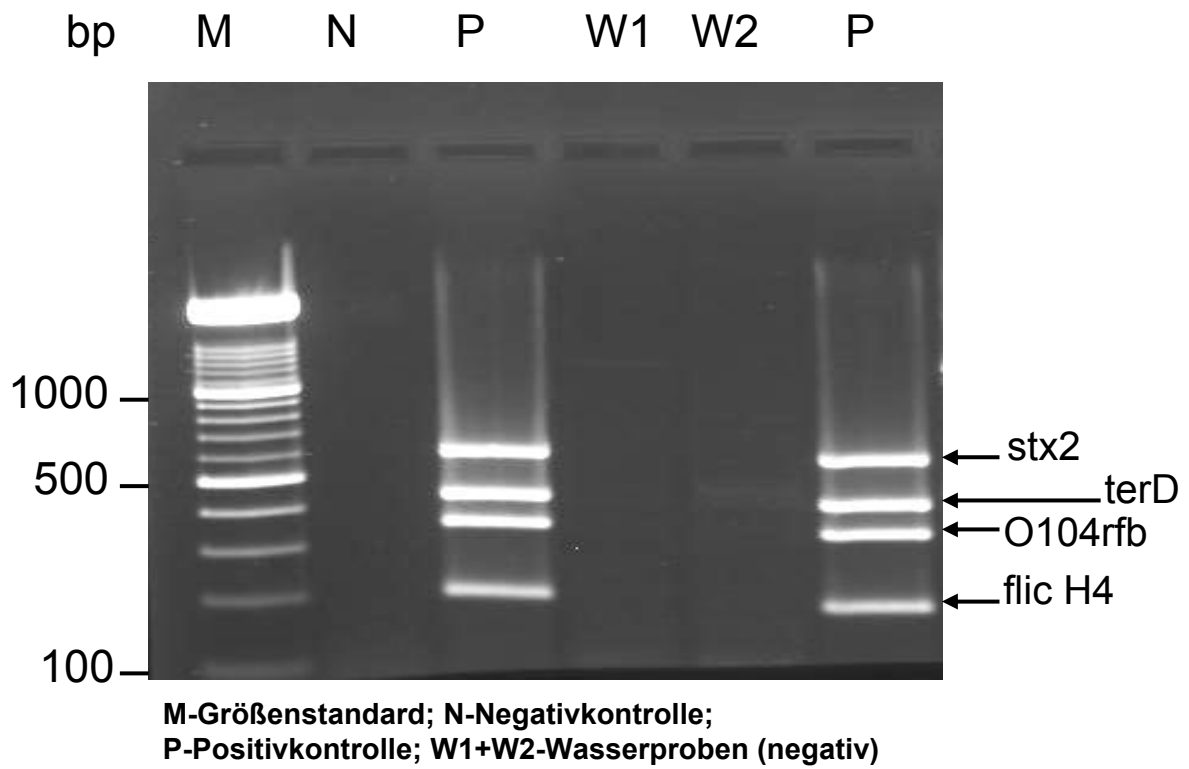


Abb. 2
Agarose-Gel Elektrophorese von 2 ESBL-*E. coli* aus Wasserproben auf molekularbiologische Merkmale des EHEC Ausbruchstammes

Ergebnisse

Anzahl *E. coli* im Abwasser beider Kläranlagen in gleicher Größenordnung

Die Bestimmung der Belastung des Abwassers mit *E. coli* mit verschiedenen Verdünnungsstufen ergab Werte im Bereich von 20.000 – 40.000 *E. coli* / 100 ml (Tab. 1), wobei die Mittelwerte der besonders gut auswertbaren Ansätze nach B mit 32415 (Cuxhaven) bzw. 32743 (Stade) sehr eng bei einander liegen. Im Prinzip könnten alle Ansätze von A - C für die weitere Bearbeitung verwendet werden. Verdünnung B enthielt jedoch die am sichersten auswertbaren Verdünnungsstufen. Die Stufen 1:2 und 1:20 waren dabei vollständig von *E. coli* bewachsen, die Stufe 1:200 noch deutlich bewachsen, während die Stufe 1:2000 nur noch vereinzelt eine positive Fluoreszenz aufwies. Da die Ansätze nach A und C etwas höhere Werte ergaben, wird für die gesamte mittlere Belastung beider Kläranlagen ein Wert von 35.000 *E. coli*/100 ml angenommen und für Risikoabschätzungen verwendet.

Tab. 1
Belastung des Abwassers der Kläranlagen Cuxhaven und Stade mit *E. coli* ermittelt nach DIN EN ISO 9308-3; Vertrauensbereiche in ()

Proben-ID	Ansatz		
	A Messbereich: 15 bis $3,5 \times 10^4$ MPN/100 ml	B Messbereich: 40 bis $3,2 \times 10^6$ MPN/100 ml	C Messbereich: 60 bis $6,7 \times 10^8$ MPN/100 ml
CUX 936	> 34660	28110 (18810-42000)	35980 (22050-58720)
CUX 937	> 34660	27270 (18260-40720)	39530 (24170-64630)
CUX 938	> 34660	35060 (23340-52680)	42900 (26210-70210)
CUX 939	> 34660	39220 (26020-59110)	42900 (26210-70210)
MittelCUX	> 34660	32415	40328
STD 940	> 34660	35060 (23340-52680)	42310 (25850-69240)
STD 941	> 34660	28110 (18810-42000)	49800 (30460-81410)
STD 942	> 34660	35060 (23340-52680)	16500 (10030-27150)
MittelSTD	> 34660	32743	36203
Gesamtmittel		Ca. 35.000	

Anzahl der ESBL-*E. coli* im Abwasser der untersuchten Kläranlagen

Für die gezielte quantitative Untersuchung auf den EHEC Ausbruchstamm O104:H4 gibt es kein genormtes Verfahren. Als Zwischenschritte zur Identifizierung eignet sich aber die Merkmalskombination β -Glucuronidase positiv und Wachstum auf ESBL Agar. Dabei konnten im Mittel mit 11 von 59 aus etwa 19 % der fluoreszierenden Vertiefungen ESBL *E. coli* nachgewiesen werden (Tab. 2).

Tab. 2

Vorkommen von *E. coli* und ESBL-*E. coli* / 100 ml im Abwasser der Kläranlagen Cuxhaven und Stade aus den Ansätzen B nach DIN EN ISO 9308-3 nach Tab.1

Proben ID	Anzahl fluoreszierender Vertiefungen	verdächtige Kolonien auf ESBL Agar KBE	Anzahl ESBL- <i>E. coli</i> MPN /100 ml	Anteil ESBL- <i>E. coli</i> / Gesamt- <i>E. coli</i> %
CUX 936	56	11	502	1,4
CUX 937	57	12	577	1,6
CUX 938	60	11	514	1,5
CUX 939	62	14	647	1,8
MittelCUX	59	12	560	1,6
STD 940	60	10	455	1,3
STD 941	56	13	628	1,8
STD 942	60	5	202	0,6
MittelSTD	59	9	428	1,2
Gesamtmittel	59	11 (19%)	Ca. 500	1,4

Das Abwasser beider Kläranlagen enthält mit ca. 500 ESBL-*E. coli* / 100 ml (Tab. 2) nicht unerhebliche Mengen *E. coli* mit Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation. Zur Vereinfachung wird für Berechnungen im Weiteren im Mittel von 500 ESBL-*E. coli* / 100 ml angenommen. Damit sind immerhin etwa 1,4 % aller *E. coli* den hoch Cephalosporin resistenten *E. coli* zu zurechnen. Die Nachwirkungen des Antibiotikaeinsatzes sind deutlich in den Kläranlagen erkennbar und bei beiden Kläranlagen ähnlich hoch.

Tab. 3

ESBL-*E. coli* nach Filtration von 10 ml Abwasser durch Membranfilter

Proben ID	Anzahl verdächtiger Kolonien auf ESBL-Agar KBE /10 ml	Anzahl ESBL- <i>E. coli</i> KBE / 100 ml
CUX 936	39	390
CUX 937	38	380
CUX 938	43	430
CUX 939	43	430
MittelCUX	41	408
STD 940	29	290
STD 941	34	340
STD 942	31	310
MittelSTD	31	313
Gesamtmittel	37	370

Vergleichbare Werte, wie im MPN Verfahren wurden auch mittels Membranfiltration der Abwasserproben gefunden. So konnten pro 10 ml Filtrationsvolumen etwa 30 – 40 blaue, verdächtige Kolonien auf den Membranfiltern detektiert werden (Tab. 3). Im Mittel liegt der

Wert mit 370 ESBL-*E. coli* / 100 ml geringfügig niedriger als der über das DIN EN ISO Verfahren ermittelte Wert von etwa 500 ESBL-*E. coli* / 100 ml (Tab. 2).

Zweistufige molekularbiologische Prüfung der ESBL –E. coli
a) *shigatoxin PCR* und b) *spezifische PCR*

Mit dem Verfahren nach DIN EN ISO 9308-3 wurden aus den 7 Kläranlagenproben insgesamt 76 und über die Membranfiltration 257 verdächtige ESBL- *E. coli* isoliert (Tab. 4).

Tab. 4
Prüfung von ESBL – *E. coli* aus dem ISO Verfahren bzw. der Membranfiltration auf Zugehörigkeit zum EHEC O104:H4 Ausbruchstamm

Proben ID	Anzahl molekularbiologisch geprüfter Kolonien					
	DIN EN ISO 9308-3			Membranfiltration		
	verdächtig	geprüft	Positiv	Verdächtig	geprüft	Positiv
CUX 936	11	11	0	39	10	0
CUX 937	12	12	0	38	11	0
CUX 938	11	11	0	43	16	0
CUX 939 ¹⁾	14	14	0	43	43	0
CUX-Summe	48	48	0	163	80	0
STD 940	10	10	0	29	8	0
STD 941 ¹⁾	13	13	0	34	34	0
STD 942	5	5	0	31	10	0
STD-Summe	28	28	0	94	52	0
Gesamt	76	76	0	257	132	0

¹⁾ vollständige Prüfung aller verdächtiger Kolonien auf dem Filter

Die 76 Isolate aus dem Verfahren nach DIN EN ISO 9308-3 wurden molekularbiologisch sowohl in der speziellen PCR nach Karch (4) als auch mittels LightCycler auf das Vorhandensein von Shiga-Toxin 1 und 2 (stx1 und stx2) geprüft (Tab. 4). Von den bei der Membranfiltration erhaltenen Isolaten wurden von zwei Proben ebenfalls alle Isolate vollständig und von 5 Membranfiltrationen jeweils ¼ des Filters mittels LightCycler auf Shiga-Toxin 1 und 2 geprüft. Eine Reihe Isolate wurde in einer zweiten Stufe auch in der spezifischen PCR nach Karch (Abb. 2) geprüft. Alle ermittelten molekularbiologischen Marker finden sich in der Tabelle 5.

Unter den getesteten 128 ESBL-*E. coli* aus Cuxhaven und den 80 ESBL-*E. coli* aus Stade wurde der Ausbruchstamm nicht nachgewiesen. Ein Stamm zeigt zwar die Merkmalskombination O104:H4 war aber stx2 negativ (Tab. 5).

Auch die wenigen Isolate, die in der LightCycler PCR ein Shiga-Toxin positives Signal gaben, erwiesen sich in der spezifischen PCR als negativ.

Tab. 5
Molekularbiologische Eigenschaften ESBL-positiver Isolate aus Kläranlagenproben

	Primärisolierung			
	DIN EN ISO 9308-3		Membranfiltration	
ESBL- <i>E. coli</i>	76		257	
Getestet	76		134	
Light Cycler PCR	positiv	Negativ	positiv	Negativ
stx1	0	76	2	132
stx2	0	76	3	131
Spezifische PCR¹	positiv	Negativ	positiv	Negativ
Getestet	73		47	
stx2	0	73	0	47
Ter D	65	8	46	1
O 104	4	69	6	41
H4	13	60	14	33
O 104 : H 4 positiv ²⁾	0	73	1	46
O 104 : H 4 stx2	0	73	0	47

¹ PCR nach Karch (4), ²⁾ stx2 negativ

Monitoring der Badegewässer

Ab 30. Mai wurden Proben aus Badegewässern, die dem Labor des Niedersächsischen Landesgesundheitsamtes in Aurich zur Untersuchung übergeben wurden, stichprobenartig auf Vorhandensein des EHEC Ausbruchstammes mit geprüft. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse nach ihrer Herkunft eher Kläranlagen beeinflusst (Küsten- und Übergangsgewässern sowie Flüsse) oder unbeeinflusst (Binnenseen) dargestellt.

Tab. 6
Monitoring an 791 Proben aus Badegewässern 2011 auf EHEC O104:H4 STX 2
(30. Mai – 13. Juli 2011)

Herkunft der Proben	Anzahl Proben mit <i>E. coli</i> -Nachweis	Vertiefungen mit Nachweis von <i>E. coli</i> (DIN EN ISO 9308-3)	Anzahl geprüfter Vertiefungen	Wachstum auf ESBL-Agar	Blaue Kolonien auf ESBL-Agar	Prüfung EHEC O104:H4 stx2 pos.
Küsten- und Übergangsgewässer, Flüsse	267	1473	540	10	1	0
Binnenseen	283	2041	660	22	5	0
Gesamt	550	3514	1200	32	6	0

¹ neben den blauen *E. coli* Kolonien wuchsen vor allem *Pseudomonas aeruginosa* Kolonien

Aus 791 Proben wurden 550 Proben ermittelt, die *E. coli* in unterschiedlicher Anzahl enthielten. Insgesamt entfielen 3514 fluoreszierende Vertiefungen auf diese Proben und aus diesen wurden 1200 Abimpfungen auf ESBL-Agar vorgenommen. In lediglich 6 Fällen waren auf ESBL-Agar

verdächtige Kolonien gewachsen. Keine davon erwies sich in der molekularbiologischen Prüfung als positiv.

Sonstige Isolierungen

Aus drei weiteren hier nicht dargestellten Proben (Nordseewasser verschiedener Regionen, das als Füllwasser für Schwimmbäder genutzt wurde) konnten bei der Untersuchung von 100 ml Probe *E. coli* nachgewiesen werden, die ESBL-positiv waren. Unter diesen Isolaten war ein *E. coli* O104:H4, der jedoch stx1 bzw. stx2 negativ war.

Diskussion

Eignung der Vorgehensweise / Plausibilitätsüberlegungen

Die EHEC/HUS Epidemie hatte bis Ende Mai ihren Höhepunkt erreicht (1). Aber erst zu dieser Zeit kristallisierte sich konkret heraus, um welchen *E. coli* EHEC Typ es sich handelte. Erst am 10. Juni 2011 veröffentlichten das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), das Bundesamt für Verbraucherschutz (BVL) und das Robert-Koch-Institut (RKI), dass mit hoher Wahrscheinlichkeit kontaminiertes Sprossengemüse die Ursache der Epidemie sei (2). Die Diskussion über die Ausbreitung dieses Erregers außerhalb des Menschen und die Frage potentieller Infektionsrisiken zum Beispiel über Wasser wurde intensiv in Presse (11) und Fachgremien (5, 6) diskutiert. Sehr schnell spielte eine möglicherweise potentielle Freisetzung über die Kläranlagen eine Rolle. Umweltepidemiologische Daten für diesen speziellen Stamm gab es nicht. Deshalb wurden auf der Basis der Erkenntnisse zu bekannten EHEC Stämmen, speziell von O157:H7, mögliche Risiken diskutiert. Eine Übersicht über einige Trink- und Badegewässerbürtige Infektionen mit dem Stamm O157:H7 wird in der Arbeit von Bülte und Goll (12) dargestellt.

Im Landkreis Cuxhaven wurde bereits gegen Ende Mai mit etwa 120 Fällen (EHEC und HUS) (3) der epidemiologische Zustand erreicht, der sich dann bis Mitte Juli nur noch geringfügig erhöhte. Im Stader Bereich begannen diese Infektionen etwas später. Der Höhepunkt zieht sich bis in den Anfang Juni hinein. Im Landkreis Cuxhaven entfielen auf etwa 1600 Einwohner und im Landkreis Stade auf 2300 Einwohner ein Erkrankter. Nach Mitteilung des Gesundheitsamtes in Stade dürfte der Anteil von Patienten im Landkreis jedoch etwas höher gewesen sein, als die Statistik mit den 87 Fällen aussagt. Im dortigen Krankenhaus waren eine Reihe EHEC Patienten aus umliegenden Landkreisen stationär aufgenommen worden, die für die abwasserspezifische Fragestellung hinzu zu rechnen wären. Im Gegenzug waren einige, allerdings wenige, dialysepflichtige Patienten aus Stade nach Hannover verlegt worden (Pallasch, pers. Mitteilung). Im Krankenhaus Stade hielten sich zum Zeitpunkt der Probenahme immer noch einige EHEC-Patienten auf. Außerdem wurde vom Gesundheitsamt Stade über Interviews zu Durchfallerkrankungen mit Betroffenen berichtet, die aber nicht labordiagnostisch bestätigt wurden. So ist sehr wahrscheinlich von einer gewissen Dunkelziffer über die bestätigte Anzahl von 87 Fällen auszugehen, die abwasserhygienisch von Bedeutung waren.

Wie Plausibilitätsüberlegungen zeigen, kann aber selbst in Kläranlagen der betroffenen Regionen Norddeutschlands der Nachweis der gesuchten EHEC Bakterien nicht unbedingt in nennenswertem Umfang erwartet werden. Als Arbeitshypothese könnte man annehmen, dass eine an EHEC Erkrankte Person nur *E. coli* des Ausbruchstammes, in etwa gleicher Menge wie eine gesunde Person normale *E. coli*, ausscheidet. Das Verhältnis erkrankter Personen zu Gesunden wäre dann gleichzusetzen mit dem Verhältnis Ausbruchstamm zu gewöhnlichem *E. coli*. Da keinerlei Daten zu Belastungswerten mit dem Ausbruchstamm EHEC O104:H4 von Patienten und Ausscheidern vorlagen, lässt sich die Plausibilität dieser Grundannahme hilfsweise anhand von Angaben zu anderen Erregern, die über den Darm ausgeschieden werden, diskutieren. So geben Bülte und Goll (12) einen Mittelwert von 10^7 KBE Shigellen/g Stuhl in der Erkrankungsphase und von 10^2 - 10^3 /g Stuhl in der Rekonvaleszenzphase an. Shigellen gelten als außerordentlich nahe Verwandte von *E. coli* (12). Ähnliche Größenordnungen wurden für *E. coli* an Gesunden mit etwa 10^4 – 10^9 KBE/g Stuhl bestimmt (12). Wenn man annimmt, dass die Ausscheiderphase nach Abklingen der Krankheitssymptome noch etwa 2-4 Wochen anhält, so dürfte diese Betrachtung zumindest für einige Wochen des Ausbruchgeschehens eine gewisse Gültigkeit gehabt haben.

Überträgt man nun diese Werte von den Shigellen auf den gesuchten Ausbruchstamm, so sollte bei einer Erkrankungsrate von 1 Erkrankten auf 1600 Gesunde auch etwa 1 EHEC O104:H4 pro

1600 „normale“ *E. coli* (Cuxhaven) erwartet werden können. Unter 35.000 *E. coli* bzw. unter etwa 500 ESBL-*E. coli* in 100 ml (Tab. 1, 2, 3) müssten somit theoretisch im Cuxhavener Abwasser etwa 22 und im Stader Abwasser etwa 15 EHEC / 100 ml des Ausbruchstammes zu finden sein. Insgesamt konnten 208 ESBL-*E. coli* (Tab. 4) geprüft werden, von denen man annehmen kann, dass sie in gewisser Weise repräsentativ waren, auch wenn sie nicht aus einer Wasserprobe stammten, oder gerade deshalb.

Insofern war die vielfach geäußerte Befürchtung bzw. Erwartung, diese Bakterien in nennenswertem Umfang im Abwasser und in Badegewässern anzutreffen zwar verständlich, möglicherweise aber auch vorschnell. Da es kein genormtes Verfahren für die Untersuchung gibt, erwies sich die Möglichkeit die gesuchten EHEC aus der Vielzahl der *E. coli* über die Fähigkeit auf ESBL Agar zu wachsen, als sehr hilfreich die Untersuchung zielgerichtet durchführen zu können.

E. coli und ESBL-*E. coli* in Kläranlagen und an Badegewässern

Untersuchungen an Kläranlagen im Rahmen von Abwasseruntersuchungen infolge von großräumigen Salmonella Kontaminationen an Badegebieten der Niedersächsischen Nordseeküste ergaben zwischen 1990 und 1993 für den damaligen Parameter Fäkalcoliforme Bakterien (13), der nahezu identisch ist mit *E. coli* (14), Konzentrationen im Mittel von deutlich über 100.000 Fäkalcoliforme Bakterien / 100 ml. Insofern ergibt sich aus der Tab. 1, dass die Belastungen an den jetzt untersuchten Kläranlagen Cuxhaven und Stade mit Werten im Bereich von etwa 20.000 – 50.000 *E. coli* / 100 ml deutlich geringer waren, als vor etwa 20 Jahren an Kläranlagen im niedersächsischen Küstenbereich gemessen werden konnten. Das ist erfreulich, denn dadurch sinkt das Risiko für Kontaminationen der Badegewässer, da davon auszugehen ist, dass damit auch der Eintrag von Krankheitserregern vermindert wird.

Interessanterweise bestand die *E. coli* Belastung in den Kläranlagen zu etwa 1 - 2% aus ESBL-*E. coli* (Tab. 2). Diese speziellen *E. coli* werden durch die Behandlung von Patienten mit Cephalosporinen der dritten Generation in medizinischen Einrichtungen selektioniert. Dieses Problem der Krankenhaushygiene kann nun am kommunalen Abwasser nachvollzogen werden, scheint sich aber wohl in größerer Entfernung von den Kläranlagen nicht unbedingt fort zu setzen. So verlagert sich das Verhältnis *E. coli* / ESBL-*E. coli* in den Badegewässerproben deutlich zugunsten der nicht auf ESBL-Medium wachsenden *E. coli* (Tab. 7). Im Küsten- und Übergangsgewässerbereich mit Flüssen sollte mit einem deutlichen Einfluss der Kläranlagen gerechnet werden. Überraschenderweise wurden hier sogar besonders wenige ESBL *E. coli* im Verhältnis zu „normalen“ *E. coli* gefunden.

Tab. 7
Isolierungsraten von ESBL – *E. coli* / 100 ml aus fluoreszierenden Vertiefungen. Proben aus Kläranlagen und Badegewässern im Vergleich

Herkunft	Fluoreszierende Vertiefungen		Verhältnis
	A	B ESBL – positiv	A : B
Kläranlage	411 ¹	76	5 : 1
Flüsse, Küsten- und Übergangsgewässer	540 ²	1	540 : 1
Binnengewässer	660 ²	5	132 : 1

¹ Gesamtanzahl aller fluoreszierenden Vertiefungen der 7 Kläranlagenproben

² 1200 fluoreszierende Vertiefungen aus Untersuchungen von Badegewässern.

Setzt man die Anzahl der geprüften fluoreszierenden Vertiefungen zu den daraus isolierten ESBL-*E. coli* ins Verhältnis, konnten bei den Proben aus Kläranlagen aus jeder fünften fluoreszierenden Vertiefung ESBL-*E. coli* isoliert werden. In den Binnenseen beträgt dieses Verhältnis 132 zu 1 ESBL-*E. coli* und bei den Küsten-, Übergangsgewässern und Flüssen steigt es auf 540 zu 1 ESBL-*E. coli*.

Das lässt die Vermutung aufkommen, dass die ESBL-*E. coli* empfindlich auf Freisetzung ins Gewässer reagieren. Es wäre aber auch plausibel, dass nicht unbedeutende Mengen der *E. coli* Isolate von Badestellen aus anderen Quellen, z.B. von Vögeln stammen und so das Verhältnis zugunsten der normalen *E. coli* verschieben. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass die Belastung von Badegewässern durch Kläranlagen gelegentlich überschätzt wird.

Abschätzung des Risikos, in Badegewässern zu erkranken

Unter der Annahme, dass der EHEC O104:H4-Stamm gegenüber Umwelteinflüssen ähnlich reagiert wie übliche *E. coli*, kann eine Abschätzung des Risikos vorgenommen werden, in Badegewässern zu erkranken. Es wird außerdem angenommen, dass mindestens 10 EHEC Bakterien oral aufgenommen werden müssen, damit es zu einer Infektion kommt. Beide Nachweisverfahren, MPN-ISO- und Filtrationsverfahren, werden unter Berücksichtigung der molekularbiologischen Untersuchungen betrachtet:

- MPN – Verfahren nach DIN EN ISO 9308-3

Aus der Norm ergibt sich für die Kläranlagenproben im Ansatz B eine Nachweisgrenze von 40 *E. coli* / 100 ml (8). Das gilt gleichermaßen für alle gewöhnlichen *E. coli* und für den Ausbruchstamm. Damit entfallen auf 35.000 *E. coli* Bakterien (Tab. 1) bzw. 500 ESBL-*E. coli* (Tab. 2) maximal 40 EHEC Bakterien. Rechnerisch ergibt sich daraus, dass auf 875 gewöhnliche *E. coli* bzw. 12 ESBL *E. coli* 1 *E. coli* O104:H4 des Ausbruchstammes erwartet werden kann. 10 EHEC entsprechen dann 8750 normalen *E. coli*. Es wird aber von uns angenommen, dass die tatsächlich vorhandene Anzahl des EHEC Ausbruchstammes deutlich unterhalb 40 / 100 ml lag.

Da alle Untersuchungen auf den Ausbruchstamm negativ waren, wurde die Nachweisgrenze regelmäßig unterschritten. Im Falle regelmäßiger Unterschreitung der Nachweisgrenze wäre bei gleichmäßigem Vorkommen des gesuchten Organismus anzunehmen, dass der jeweilige Messwert alle Werte zwischen 0 und 40 / 100 ml annehmen kann. Somit ist es durchaus üblich, als wahrscheinlicheren Wert die halbe Nachweisgrenze (20 / 100 ml) anzunehmen, wodurch auf etwa 17.500 „gewöhnliche“ *E. coli* 10 *E. coli* O104:H4 entfallen. Es kann natürlich auch sein, dass der gesuchte Stamm überhaupt nicht mehr mit den Methoden nachweisbar war oder bereits auf dem Weg vom Ausscheider zum Ablauf der Kläranlage abgetötet wurde.

- Filtrationsverfahren

Mit dem Membranfiltrationsverfahren wurde eine vom Verfahren nach DIN EN ISO 9308-3 unabhängige zweite Untersuchung der Abwasserproben durchgeführt. Von den 7 Abwasserproben wurden zwei vollständig molekularbiologisch auf den Ausbruchstamm geprüft und 5 zu je einem Viertel.

Im Falle der Proben CUX 939 und STD 941 liegt eine Nachweisgrenze von 10 *E. coli* O104:H4 / 100 ml vor (10 ml Filtrationsvolumen, alle verdächtigen Bakterien wurden molekularbiologisch geprüft, Tab. 4). In keinem Fall konnte der Ausbruchstamm nachgewiesen werden. Auch aus den übrigen, nur zu einem Viertel untersuchten Filtern konnte kein Nachweis geführt werden. Unter Bezug auf die ermittelte *E. coli* Konzentrationen aus dem DIN EN ISO Verfahren von 35.000 *E. coli* / 100 ml kämen somit unter ungünstigster Annahme auf 35.000 „normale“ *E. coli* 10 *E. coli* O104:H4.

Schleswig-Holstein war ebenfalls in besonderer Weise wie einzelne Regionen Niedersachsens von der EHEC Problematik betroffen. Bei einer Untersuchung von 32 Proben aus Kläranlagen konnte in keinem Fall der EHEC-Ausbruchstamm nachgewiesen werden (15).

Wie aus den Tabellen 1 und 2 deutlich wird, beträgt das Verhältnis 35.000 *E. coli* zu 500 ESBL-*E. coli*. Von allen Isolaten konnten aus der Kläranlage Cuxhaven 128 und aus der in Stade 80 ESBL-*E. coli* (insgesamt etwa 42 %) molekularbiologisch (Tab. 4) geprüft werden. Der ausbleibende Nachweis von EHEC unter den 208 von 500 geprüften ESBL *E. coli* zeigt, dass die Anzahl EHEC O104:H4 stx2 unter 2-3 Bakterien / 100 ml lag.

Fazit

Die Wahrscheinlichkeit in einem Badegebiet, welches durch Kläranlagen kontaminiert werden kann, (gesamte Niedersächsische Nordseeküste, Übergangsgewässer und Flüsse mit Kläranlageneinfluss) gegen Ende der EHEC Epidemie auf EHEC O104:H4 Shiga-Toxin-positiv in einer Anzahl zu treffen, die zu einer Infektion führen könnte, war äußerst unwahrscheinlich. Das gilt sogar für solche Regionen, in denen eine besonders große Anzahl an EHEC Patienten aktuell diese Bakterien ausscheidet, zumindest für den Untersuchungszeitraum gegen Ende Juni 2011. Insofern überrascht es auch nicht, dass der durch die Presse bekannt gewordene Fall eines Nachweises des Ausbruchstammes im Erlenbach in Frankfurt (11), letztlich doch kein *E. coli* EHEC O104:H4 des Ausbruchstammes war (16). Die beiden im Rahmen dieser Untersuchungen nachgewiesenen O104:H4 *E. coli* waren ebenso stx2 negativ und somit nicht am Ausbruchgeschehen beteiligt.

Tab. 8
Belastungen bei 6334 Untersuchungen niedersächsischer Badegewässer mit *E. coli* in den Jahren 2008-2010

Jahr	<i>E. coli</i> MPN / 100 ml	Küsten- und Übergangsgewässer, Flüsse		Binnenseen	
		Anzahl Proben		Anzahl Proben	
2008	≤ 100	245	(73 %)	1357	(90 %)
	> 100 - 1800	98	(26 %)	150	(10 %)
	> 1800 - 5000	1	(1 %)	1	(< 1%)
	> 5000	0		0	
2009	≤ 100	491	(~ 83%)	1497	(91 %)
	> 100 - 1800	98	(~ 17%)	143	(9 %)
	> 1800 - 5000	1	(< 1%)	3	(< 1%)
	> 5000	0		0	
2010	≤ 100	524	(89 %)	1477	(89 %)
	> 100 - 1800	63	(11 %)	179	(11 %)
	> 1800 - 5000	0		6	(< 1%)
	> 5000	0		0	

Zu einem Badeverbot kommt es bei einer Überschreitung des Wertes von 1.800 *E. coli* / 100 ml (7). Dieser Wert wird bei Badegewässeruntersuchungen nur äußerst selten erreicht (Tab. 8). In den Jahren 2008 bis 2010 wurden bei 6334 Badegewässeruntersuchungen in Niedersachsen bei 12 Untersuchungen dieser Wert überschritten. Das entspricht etwa 0,2%. Werte > 5000 *E. coli* / 100 ml wurden nicht gemessen. Damit ist eine sehr hohe Sicherheitsmarge bei der

Überwachung der Badegewässer gewährleistet. Bei der stichprobenartigen Untersuchung von etwa 550 *E. coli*-positiven Badegewässerproben (2011, 30. Mai – 13 Juli) konnte der EHEC-Ausbruchstamm in keinem Fall nachgewiesen werden (Tab. 6). Bei diesem Badegewässer-Monitoring wurden von 3514 verdächtigen *E. coli* 1200 geprüft. Aufgrund des fehlenden Nachweises der gesuchten EHEC Bakterien kann angenommen werden, dass selbst bei *E. coli* Konzentrationen im Gewässer von über 35.000 (normalen) *E. coli* / 100 ml in Gebieten mit hohem Anteil an Ausscheidern in der Bevölkerung kein Risiko zu einer Infektion mit dem gesuchten EHEC *E. coli* bestand. Untersuchungen zur Eliminierung von *E. coli* zeigten eine Reduktionsrate von nahezu 4 Zehnerpotenzen nach Freisetzung in natürliches Seewasser (17) innerhalb von 2 Tagen. Auch hieraus kann geschlossen werden, dass kontaminierende EHEC Bakterien, selbst wenn sie über die Kläranlagen freigesetzt würden, sehr schnell beseitigt werden. Solche Belastungen wären allerdings unter hygienischem Gesichtspunkt für Gewässer, insbesondere Badegewässer absolut untolerierbar.

Möglich ist auch, dass der durch die Umstände bedingte späte Zeitpunkt der Kläranlagenuntersuchung ausbleibende Nachweise, vor allem im Bereich Cuxhaven begünstigt hat. Nach Auskunft des GA in Stade wurden bei den zu überwachenden Personenkreisen allerdings mindestens eine Ausscheidungsdauer von 22 Tagen, maximal von 136 Tagen und im Median von 52 Tagen festgestellt. Damit wurden die Ausscheidungsfälle zum größten Teil am Untersuchungszeitpunkt der Kläranlagen mit erfasst. Auf der anderen Seite zeigt der fehlende Nachweis, dass, selbst wenn es zu größeren Freisetzungen gekommen sein sollte, diese extrem schnell wieder zurück gingen. Offensichtlich benötigt der Bakterienstamm ein geeigneteres Trägermaterial als Wasser.

Danksagung:

Wir danken dem gewässerhygienischen Labor (NLGA-Aurich) und dem molekularbiologischen Labor (NLGA-Hannover) für die ausgezeichnete Laborarbeit. Des Weiteren gilt unser Dank den Mitarbeitern der Gesundheitsämter Cuxhaven und Stade, die in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Kläranlagen für die Proben gesorgt haben und uns auch mit Informationen zum Geschehen vor Ort versorgt haben.

Siehe auch:

**Zum Risiko der Ausbreitung von *E. coli*/EHEC O104:H4 stx 2 positiven Bakterien über Kläranlagen während der EHEC – Epidemie 2011 in Norddeutschland
E.-A. Heinemeyer, K. Luden und M. Monazahian
Gesundheitswesen 2012; 74; 1-3**

Literatur

- 1) Anonym: Intensivierte Surveillance während eines großen EHEC-/HUS-Ausbruchs in Deutschland, Mai-Juni 2011. Epidemiologisches Bulletin Nr. 25 vom 27. Juni 2011
- 2) Anonym: HUS Epidemie 2011 http://de.wikipedia.org/wiki/HUS-Epidemie_2011-07-28
- 3) Meldezahlen nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) im Rahmen des Ausbruchsgeschehens an das Niedersächsische Landesgesundheitsamt, Roesebeckstraße 4-6, 30449 Hannover
- 4) Karch (2011) Laborinformation zum EHEC Ausbruchsstamm; Konsiliarlabor für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS); www.ehec.org
- 5) UBA Stellungnahme des UBA nach Anhörung der Schwimm- und Badebeckenwasserkommission zum aktuellen Ausbruchsgeschehen und zum Thema Baden http://www.umweltdaten.de/wasser/themen/badebeckenwasser/stellungnahme_des_uba_zu_ehec_baden.pdf
- 6) UBA (22. Juni 2011) FAQ Liste zu EHEC http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit/publikationen/faq_ehec.pdf
- 7) Verordnung über die Qualität und die Bewirtschaftung der Badegewässer. Nds. GVBl. Nr. 7/2008, S. 105-112
- 8) DIN EN ISO 9308-3 DEV Sammlung 47. Lieferung 2000 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA , Weinheim und Beuth-Verlag GmbH, Berlin
- 9) Oxoid-Produktinformation ESBL 2010. <http://www.oxoid.com>
- 10) Pulz M., Matussek A., Monazahian M., Tittel A., Nikolic E., Hartmann M., Bellin T., Buer J., Gunzer F.: Comparison of a shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of shiga toxin-producing Escherichia coli in human stool specimens. J Clin Microbiol. 2003 Oct;41(10):4671-
- 11) Ruhenstrot, M. Die dunkle Seite des Wassers. Frankfurter Allgemeine Sonntagszeitung vom 17. Juli 2011 S. 56
- 12) Bülte M. und M. Goll. Escherichia coli und Shigellen (2006). B. Behrs Verlag GmbH & Co.KG, Averhoffstraße 10, 22085 Hamburg ISBN 3-89947-255-1
- 13) Tobias H. und Heinemeyer E.A. (1994): Möglichkeiten der Keimreduktion durch moderne Kläranlagentechnik am Beispiel der Kläranlage in Norden/Ostfr. In Hygiene, Mikrobiologie und Salmonellen in Küstengewässern. Tagungsband zum Symposium am 16. November 1993 Hrsg. E.A. Heinemeyer, Osfriesische Landschaft-Aurich ISBN: 3-925365-82-6
- 14) Alecsic S., J. Bockemühl, G. Schulze, G. Havemeister, E.A. Heinemeyer, H.E. Müller und E. von Pritzbur: Reaktionen verschiedener Enterobacteriaceae- und Vibrionaceae-Spezies in Brila-Mug (Fluorocult)-Bouillon. Zbl. Hyg. 190, 395-403 (1990)
- 15) Anonym: http://www.schleswig-holstein.de/MASG/DE/Gesundheit/OeffentlicherGesundheitsdienst/EHEC/Startseite/110727_KeinEhecInKlaeranlagen.html
- 16) http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/46942/EHEC-Alarm_fuer_Frankfurter_Erlenbach_war_vorschnell.htm
- 17) Glaus H. und E.A. Heinemeyer (1994) The elimination of Salmonella typhimurium in coastal waters with various levels of microbiologically hygienic contamination. Zbl. Hyg. 196, 312-326