

TITEL: Risikofaktoren der Belastung durch Shigatoxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) in Kläranlagen

ENGL. TITEL: Risk factors for abundance of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in sewage water

AUTOREN: F. Burckhardt¹, A. Heißenhuber¹, G. Morlock¹, U. Busch¹, P. Schindler¹, A. Fruth², A. Ammon³, M. Wildner¹

AFFILIATION:

¹Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Bavarian Health and Food Safety Authority)

²Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Wernigerode

³Abteilung für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut, Berlin

WÖRTER (Ohne Abstract und Literatur): 1078

TABELLEN: 3

KORRESPONDENZ:

Dipl. Biol. F. Burckhardt, MSc

Bayer. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Veterinärstr. 2

85764 Oberschleissheim

Phone +49 89 31560 161

Fax +49 89 31560 404 (458)

Email: florian.burckhardt@lgl.bayern.de

Kurzzusammenfassung

Die Belastung des Oberflächenwassers mit Shigatoxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) durch den Eintrag von Kläranlagenabwasser stellt eine potentielle Infektionsquelle für menschliche Infektionen mit STEC^a dar. Acht bayerische Kläranlagen wurden von 2003 bis 2004 nach einem vorgegebenen Plan regelmäßig beprobt. In 95 von 378 Proben (25%) konnte der Nachweis von einem der Shigatoxin-Gene *stx1* und *stx2* geführt werden. Die Eliminationsrate betrug 44%. Mittels logistischer Regression wurde der Einfluss von Standort, Technik und Probenentnahme untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Lage im ländlichen Bereich das Chancenverhältnis (odds-ratio) für eine *stx1* und/oder *stx2* positive Probe um 1,7 (95%KI 1,03-2,69; p=0,038) und die Entnahme am Zulauf um 2,1 (95%KI 1,28-3,36; p=0,003) erhöhen. Bei Vorliegen einer STEC-Belastung konnte statistisch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der bautechnischen Voraussetzungen der Kläranlage nachgewiesen werden (2 oder 3 Reinigungsstufen). Es wurde jedoch eine nicht signifikante Erhöhung um den Faktor 1,5 (95%KI 0,94-2,44; p=0,087, not significant) für dreistufige Anlagen gefunden. Probenentnahme nach Regenfällen und nach Trockenheit hatten keinen Einfluss auf die STEC-Belastung (univariater Chi-Quadrat=0,01; df1; p=0,920). Erwartungsgemäß zeigte sich die Lage im ländlichen Bereich als Risikofaktor für erhöhte STEC-Belastungen im Abwasser. Der Einfluss der Klärwerkstechnologie auf die STEC-Belastung bedarf weiterer Klärung.

Stichworte: Shiga-Toxin, Kläranlage, Risikofaktor, EHEC, STEC

Abstract

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) in sewage influent into surface water are a potential source of human infections with STEC. Eight sewage treatment plants in Bavaria, Germany, were sampled at regular intervals from 2003 to 2004 in order to estimate STEC load and quantify risk factors. 95 of 378 samples (25%) were tested positive for *stx1* and/or *stx2* with PCR after enrichment culture. STEC elimination after treatment was 44%. The following risk factors were analysed with logistic regression: location of sewage plant (rural vs. urban), treatment plant technology (two stage vs. three stage treatment) and sampling location (sewage input vs. sewage output). Rural plants had odds-ratios of 1,7 (95%CI 1,03-2,69; p=0,038) for a positive *stx1* and/ or *stx2* PCR result, sampling at sewage input of 2,1 (95%CI 1,28-3,36; p=0,003) and three stage plants of 1,51 (95%CI 0,94-2,44; p=0,087, not significant). Sampling after rain and after dry spells had no impact on STEC abundance (univariate Chi-square test=0,01; df1; p=0,920). Rural sewage plants had higher odds of STEC content. The influence of the sewage plant technology on the STEC load requires further clarification.

Keywords: Shiga toxin, sewage, risk factor, EHEC, STEC

^a Die nach IfSG in der Humanmedizin gültige Bezeichnung „EHEC“ (Enterohämorrhagische *Escherichia coli*) wird durch die generische Bezeichnung „STEC“ (Shigatoxin bildende *Escherichia coli*) ersetzt, da nach heutigem Kenntnisstand jeder STEC als potentieller EHEC betrachtet werden kann.

Einleitung

In vorausgegangenen Untersuchungen wurde beobachtet, dass beprobtes Oberflächenwasser regelmäßig mit STEC belastet war¹⁻⁶. Potentielle Quellen hierfür wurden in der flächenhaften Belastung durch gewässernahen Viehtrieb, Weidenutzung, Gülleausbringung oder punktuelle Abwassereinleitungen aus Kläranlagen vermutet⁷⁻⁹. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Bedeutung der Kläranlagenabwässer für den Eintrag von Shigatoxin bildenden E. coli (STEC) Keimen in Oberflächengewässer aufzuklären.

Methoden

Von 2003 bis 2004 wurden die Zu- und Abläufe von acht bayerischen Kläranlagen beprobt, die am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) analysiert wurden¹⁰⁻¹¹. Aufgrund des hohen Laboraufwands wurde nur bei wenigen Wasserproben eine Keimisolierung für die Serotypisierung durchgeführt. Den PCR Testungen ging eine Anreicherungskultur voraus, um eine Störung durch nackte DNA oder nicht mehr infektiöse Phagen auszuschließen.

Für die Berechnung der Eliminationsquote wurde der Keimnachweis im Zulauf mit dem Nachweis im Ablauf unter Annahme eines Gleichgewichtszustandes in Verhältnis gesetzt. Für die Untersuchung wurden Kläranlagen nach Lage (Stadt – Land) und Technik (zweistufig – dreistufig) geschichtet ausgewählt, wobei auch die quantitative Reinigungsleistung mit erfasst wurde. Beprobte wurde im Jahr 2003 jede zweite Woche in den Monaten Januar bis März und Juni bis August und im Jahr 2004 niederschlagsabhängig. Einem evtl. gemeinsamen Auftreten von STEC in Abwasserproben mit Infektionen beim Menschen wurde nachgegangen. Dafür wurden die Positivraten der Klärwerksuntersuchung mit den Meldungen der Humaninfektionen mit EHEC nach dem Infektionsschutzgesetz korreliert. Diese Meldedaten wurden der Datenbank SurvNet des Robert Koch-Institutes (RKI) entnommen, wobei eine Spanne von 4 Wochen vor bis 4 Wochen nach Beprobung berücksichtigt wurde. Die multivariate Analyse auf Unterschiede in der STEC-Belastung zwischen ländlichen und städtischen, zwei- und dreistufigen Anlagen und zwischen Zulauf und Ablauf wurde mittels logistischer Regression mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows (Rel. 10.0.7. 2000, Chicago: SPSS Inc.) durchgeführt.

Ergebnisse

Die positiven STEC Befunde sind in Tabelle 1 abgebildet. Im Jahr 2003 wurden in 23 von 188 Proben (12%), im Jahr 2004 in 72 von 184 Proben (39%) mittels PCR Shigatoxin-Gene nachgewiesen. Die Ergebnisse der Serotypisierung sind in Tabelle 2 abgebildet. Die Eliminationsrate von STEC aus dem Abwasser betrug 44 %. Eine Kreuzkorrelation der Zeitreihe der positiven Befunde bei den Klärwerken mit der Zeitreihe der Humaninfektionen mit EHEC zeigte keine Signifikanz. (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnten für 2004 ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Raten an STEC Nachweisen im Abwasser nach längerem Regen oder nach Trockenheit (Chiquadrat=0,01; df1; p=0,920) festgestellt werden.

Die multivariate Analyse auf Unterschiede in der STEC-Belastung zwischen ländlichen und städtischen, zwei- und dreistufigen Anlagen und zwischen Zulauf und Ablauf wurde für den gesamten Datensatz aus den Jahren 2003-2004 mittels logistischer Regression durchgeführt (Tabelle 3). Die Chancen, einen positiven STEC-Befund zu bekommen, erhöhten sich signifikant durch Lage im ländlichen Bereich um den Faktor 1,7

und durch Probennahme am Zulauf um den Faktor 2,1, während Technik (zwei- oder dreistufig) grenzwertig auf dem 5%-Niveau nicht signifikant war (Tabelle 3).

Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte den in der Literatur^{2 12-14} diskutierten Eintrag von humanpathogenen Erregern in Oberflächengewässer durch Kläranlagen. Von Januar 2003 bis Herbst 2004 wurden 387 Wasserproben aus bayerischen Kläranlagen auf Vorkommen von STEC untersucht, wobei auf technische, geographische und klimatische Unterschiede Rücksicht genommen wurde (Tabelle 1). Die Studie ist damit eine der umfangreichsten auf ihrem Gebiet.

Es zeigte sich zunächst in der Zwischenauswertung für 2003, dass die STEC Belastung davon unabhängig war, ob die Kläranlage auf dem Land oder in der Stadt stand und ob sie über eine „dritte“ Reinigungsstufe mit Sandfiltration, Phosphatfällung, Denitrifikation und gegebenenfalls UV-Desinfektion verfügte (Ergebnisse nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Probenplan angepasst und die Wasserproben wurden im Jahr 2004 in Abhängigkeit vom Niederschlag gezogen.

Der Anteil der positiven Proben aus einer städtischen Kläranlage betrug 20% gegenüber 30% einer ländlichen Anlage und war in der multivariaten adjustierten logistischen Regression statistisch signifikant (Odds-Verhältnis von 1,7 für Landlage; $p=0,038$; Tabelle 3). Erwartungsgemäß waren die Chancen höher, am Kläranlagenzulauf eine positive STEC Probe zu ziehen (Odds-Verhältnis von 2,1 für Zulauf; $p=0,003$; Tabelle 3). Die technische Ausstattung der Kläranlagen hatte statistisch gesehen keinen Einfluss, wobei interessanterweise dreistufige Anlagen einer erhöhten STEC-Belastung unterlagen. Möglicherweise selektiert die dritte Reinigungsstufe verstärkt STEC-Bakterien. Der genaue Mechanismus ist angesichts der komplexen Interaktionen im Ökosystem „Klärwerk“ noch weitgehend unbekannt. 44% der im Zulauf vorhandenen STEC-Keime wurde durch die Behandlung in der Kläranlage eliminiert. Allerdings ist die Berechnung der STEC-Eliminationsrate an Hand des Verhältnisses Keime im Ablauf zu der Anzahl der Keime im Zulauf unsicher, da Zu- und Ablauf in einem kürzeren zeitlichen Abstand als die anzunehmende Verweildauer des Wassers in der Kläranlage beprobt wurden.

Zwei Kläranlagen verfügten ausschließlich über eine Trennkanalisation, welche Regenwasser am Reinigungskreislauf vorbeiführt. Bei einer Trennkanalisation werden Schmutz- und Niederschlagswasser im Gegensatz zur Mischkanalisation getrennt abgeleitet, wobei das Regenwasser hinter dem Klärwerk direkt in ein Gewässer eingeleitet wird. Durch diese Konstruktion wird ein Eintrag z.B. aus Viehweiden über das Regenwasser in die Kläranlage konstruktionsbedingt verhindert und die tatsächliche STEC-Belastung der Kläranlage fällt geringer aus. Beide Kläranlagen sind dreistufig und befinden sich auf dem Land, die tatsächliche STEC-Belastung für diese beiden Gruppen wurde daher systematisch unterschätzt. Durch eine Korrektur würde sich sowohl die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den technischen Systemen erhöhen, als auch der Unterschied der STEC-Belastung zwischen Stadt und Land vergrößern (Tabelle 3).

Keinen Einfluss auf die STEC-Belastung hatten die Niederschlagsverhältnisse vor der Probenentnahme. Es ist unwahrscheinlich, dass eine höhere Stichprobenzahl dies ändern würde.

Eine weitere Studienhypothese war, dass sich ein gehäufter STEC-Eintrag durch Kläranlagen in vermehrt gemeldeten Fällen von EHEC-Infektionen bei Menschen manifestiert. Ein Zeitreihenvergleich der STEC-Nachweise aus den Kläranlagen mit den wöchentlichen Meldedaten des RKI ergab jedoch auch unter Berücksichtigung einer zeitlichen Verzögerung keinen solchen Zusammenhang. Einschränkend muss festgestellt werden, dass die Datenlage für diese Fragestellung wenig belastbar war, zum einen aufgrund der Verwendung von aggregierten Daten, zum anderen wegen der insgesamt geringen Fallzahlen.

Der Nachweis von Infektketten ist derzeit gering, da zum einen großflächiger Umweltproben genommen werden müssten und zum anderen nur eine verhältnismäßig kleine Zahl an STEC-positiven Kolonien überhaupt erschöpfend mit verschiedenen Methoden (z.B. Serotypie) typisiert werden kann. Zudem ist nicht geklärt, ob auch *Escherichia coli* der normalen menschlichen Darmflora durch Transfer der *stx1* und *stx2* Gene zu STEC/EHEC konvertieren können. Für zukünftige Studien wären zudem Feintypisierungen auf molekulargenetischer Basis möglicherweise anzustreben.

Trotz durchschnittlicher Reduktion der Belastung durch STEC-Bakterien um 44% muss davon ausgegangen werden, dass ein STEC-Eintrag in Oberflächengewässer durch Kläranlagen stattfindet und durch Faktoren wie „Lage in ländlichem Gebiet“ und wahrscheinlich auch durch die Klärwerkstechnologie erhöht wird. Während auf dem Land ein vermehrter Eintrag durch Weideviehhaltung plausibel nachvollziehbar ist, steht die Aufklärung der ökologischen Wechselwirkungen im „Ökosystem Kläranlage“ noch am Anfang und bedarf weiterer Forschung zur gezielten Bekämpfung von STEC.

Danksagung:

Wir möchten uns bei Frau Staub von der Regierung von Oberbayern, den Mitarbeitern der Gesundheitsämter und der Kläranlagen für die Unterstützung bedanken. Das Projekt wurde im Rahmen des Verbundprojekt: Infektionsepidemiologisches Forschungsnetzwerk: Lebensmittelbedingte Infektionen in Deutschland durchgeführt, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (FKZ: 01KI0208) gefördert wurde.

Lage	Technik	Entnahme	Anzahl Proben 2003	Positive <i>stx1/2</i> Befunde 2003	Anzahl Proben 2004	Positive <i>stx1/2</i> Befunde 2004
Stadt	zweistufig (Wartenberg+, Vohburg+)	Zulauf	22	1	24	7
		Ablauf	22	3	24	6
	dreistufig (Bad Tölz+, München II+)	Zulauf	24	6	20	10
		Ablauf	24	-	20	4
Land	zweistufig (Indersdorf+, Mörlbach+)	Zulauf	24	3	24	11
		Ablauf	24	2	24	8
	dreistufig (Geiselbullach*, Starnberg*)	Zulauf	24	5	24	18
		Ablauf	24	3	24	8
Gesamt			188	23 (12%)	184	72 (39%)

Tabelle 1: Verteilung der positiven Befunde auf die beprobten Kläranlagen, *Trennkanalisation, +Mischkanalisation

Serotyp	<i>stx</i> -Gen	Enterohämolysin (genotypischer Nachweis: <i>ehxA</i> -Gen)
2003		
O8:Hrauh,	<i>stx2</i>	negativ
O8:Hnt,	<i>stx2</i>	negativ
2004		
O76:H19	<i>stx1, stx2</i>	positiv
O174:H21	<i>stx2</i>	negativ
O9:H-	<i>stx2</i>	negativ
Orauh:H12	<i>stx2</i>	negativ
O77:H18	<i>stx1</i>	positiv
O15:H8	<i>stx2</i>	negativ
Ont:H-	<i>stx2</i>	negativ
O55:H12	<i>stx1, stx2</i>	negativ
Ont:H-	<i>stx2</i>	negativ
O9:H-	<i>stx2</i>	negativ

Tabelle 2: Serotypisierungen für 2003 und 2004

Variable	adjustierte Odds Ratio	p-Wert (Signifikanz)
Technik (2 vs. 3 stufig)	1,51 (95% CI: 0,94 - 2,44)	0,087
Lage (Land vs. Stadt)	1,66 (95% CI: 1,03 – 2,69)	0,038
Probenort (Zulauf vs. Ablauf)	2,08 (95% CI: 1,28 - 3,36)	0,003
Kodierung: STEC-Befund (0=negativ, 1=positiv), Technik (0=zweistufig; 1=dreistufig), Lage (0=Stadt; 1= Land), Probenort (0=Ablauf; 1=Zulauf)		

Tabelle 3: Gegenseitig adjustierter Einfluss von Technik, Lage und Probenort auf den *stx1/2*- Gen-Nachweis.

LITERATUR:

1. Grant SB, Pendroy CP, Mayer CL, Bellin JK, Palmer CJ. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(9):3466-9.
2. Holler C, Koschinsky S, Witthuhn D. Isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* from municipal sewage. *Lancet* 1999;353(9169):2039.
3. Muniesa M, Jofre J. Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the Stx 2 gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiol Lett* 2000;183(1):197-200.
4. Maule A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2000(29):71S-78S.
5. Kurokawa K, Tani K, Ogawa M, Nasu M. Abundance and distribution of bacteria carrying stII gene in natural river water. *Lett Appl Microbiol* 1999;28(5):405-10.
6. Keene WE, McAnulty JM, Hoesly FC, Williams LP, Jr., Hedberg K, Oxman GL, et al. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 1994;331(9):579-84.
7. Spano G, Beneduce L, Terzi V, Stanca AM, Massa S. Real-time PCR for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and cattle wastewater. *Lett Appl Microbiol* 2005;40(3):164-71.
8. Chern EC, Tsai YL, Olson BH. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(1):356-62.
9. Vernozy-Rozand C, Montet MP, Lequerrec F, Serillon E, Tilly B, Bavai C, et al. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J Appl Microbiol* 2002;93(3):473-8.
10. Schindler PRG, Elmer-Englhard, D. und Huber, H.Ch. Überwachung der Badegewässer in Südbayern unter Berücksichtigung aktueller Krankheitserreger. *Münchn. Beitr. Abw.-, Fisch.- u. Flußbiol.* 2003;55:41-60.
11. Kugler R, U. Busch, M. Bayer, L. Gerber, G. Hellein, V. Barankay, H.Ch. Huber. Vergleich von ELISA, Verozelltest, PCR und immunmagnetischer Separation (IMS) in der Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Stuhlproben. *Bundesgesundhbl.* 1998(41):13-19.
12. Muniesa M, Jofre J. Abundance in sewage of bacteriophages infecting *Escherichia coli* O157:H7. *Methods Mol Biol* 2004;268:79-88.
13. Tanji Y, Mizoguchi K, Yoichi M, Morita M, Kijima N, Kator H, et al. Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157:H7 in a wastewater treatment plant. *Water Res* 2003;37(5):1136-42.
14. Blanch AR, Garcia-Aljaro C, Muniesa M, Jofre J. Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx2* gene from urban sewage. *Water Sci Technol* 2003;47(3):109-16.