

3.5. Fachbereich 5

Diagnostik und Epidemiologie

- Diagnostik und Epidemiologie von Infektionskrankheiten, die vom Tier auf den Menschen übertragbar sind.
- Referenzlabor der Europäischen Union (EU) für die Epidemiologie der Zoonosen (CRL-E).
- Nationale Referenzlaboratorien für Salmonellen (NRL-Salm), E. coli (NRL-E.c.), Brucellose (NRL-Bruc), Trichinellose (NRL-Trich) sowie für die Epidemiologie der Zoonosen (NRL-E).
- Amtliche Zulassung von in-vitro-Diagnostika nach § 17c TierSG.
- Bakteriologische, virologische und parasitologische Forschung zu ausgewählten Zoonosen.

3.5.1. Einfluss der Fütterung auf E. coli und VTEC im Kot von Rindern

Heinz Richter, Marita Timm, Simone Lehmann, Heide-Marie Lochotzke

Gesunde Rinder scheiden in unterschiedlicher Häufigkeit und Menge Verotoxin-bildende E. coli (VTEC) mit dem Kot aus. Solche VTEC können beim Menschen zu einer EHEC (enterohämorrhagische E. coli)-Infektion mit blutigem Durchfall, mit Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) und mit tödlichem Ausgang führen. Eine EHEC-Infektion ist von verschiedenen, nur zum Teil bekannten Faktoren abhängig. Neben der Verotoxinbildung spielen bestimmte weitere Virulenzfaktoren (eae-Gen, EHEC-Hämolysin) eine wichtige Rolle. Auch eine erworbene Säureresistenz von VTEC wird als wesentlicher Faktor für die Auslösung einer EHEC-Infektion diskutiert, da VTEC mit dieser Eigenschaft wahrscheinlich bereits in geringer Zahl die Säurebarriere im Magen des Menschen überwinden können. Nach Untersuchungen von Diez-Gonzalez et al. (1998) scheiden Rinder bei überwiegender Getreide-Fütterung im Vergleich zu reiner Heu-Fütterung 10^6 -mal mehr säureresistente E. coli mit dem Kot aus. Die Schlussfolgerung, dass eine kurze Heufütterung vor dem Schlachten das Risiko einer Lebensmittel-bedingten E. coli-Infektion reduziert, blieb nicht unwidersprochen (Hancock u. Besser, 1999). Nach Hovde et al. (1999) kann eine Heufütterung die E. coli O157-Infektionsgefahr für den Menschen sogar vergrößern. Als Beitrag zur Klärung des Fütterungseinflusses auf die Ausscheidung von E. coli, speziell von VTEC und deren Säureresistenz wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Versuchstiere: 10 weibliche HF-Rinder, 1,3-4,3 Jahre alt, 8 davon trächtig, separat aufgestellt im Mittellangstand des Versuchsgutes des BgVV.

Fütterung: Woche 1 - 2: Raufutter (Mischration aus Maissilage, Heu, Stroh, Zuckerrübenschnitzel), Woche 3 - 4: Kraftfutter (2/3 der Maissilage durch 6,0-8,5 kg Maisschrot ersetzt), Woche 4 - 6: Raufutter (reine Heuration), Woche 7 - 9: Kraftfutter wie in Woche 3 - 4, Woche 10 - 12: Raufutter (reine Heuration).

Untersuchungsmaterial und Methoden: Über den Versuchszeitraum wurden von jedem Tier insgesamt 16 Kotproben rektal jeweils zwischen 7 und 8 Uhr morgens entnommen. Der pH-Wert des Kotes (1 g Kot in 9 ml 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert) wurde mit dem pH-Meter 410A (Orion) und der pH-Elektrode BlueLine 25 pH (Schott) am Entnahmetag gemessen. Am Folgetag wurden die E. coli-Konzentrationen vor und nach Säureschock bestimmt. Dazu wurden die Kotproben in 0,9%iger NaCl-Lösung (3g in 27 ml) suspendiert. Nach gründlichem Vortexen wurden die Lebendkeimzahlen (LKZ) auf MacConkey-Agar-Platten (KbE E.coli/g Kot vor Säureschock) bestimmt. 20ml der Kotsuspensionen wurden mit 1ml Glycin-HCl-Puffer(10x) auf ~pH 2,5 eingestellt und 1h bei +37°C inkubiert. Nach anschließender Neutralisation mit 1n NaOH auf ~pH 7,5 wurden erneut die LKZ auf MacConkey-Agar (KbE E.coli/g Kot nach

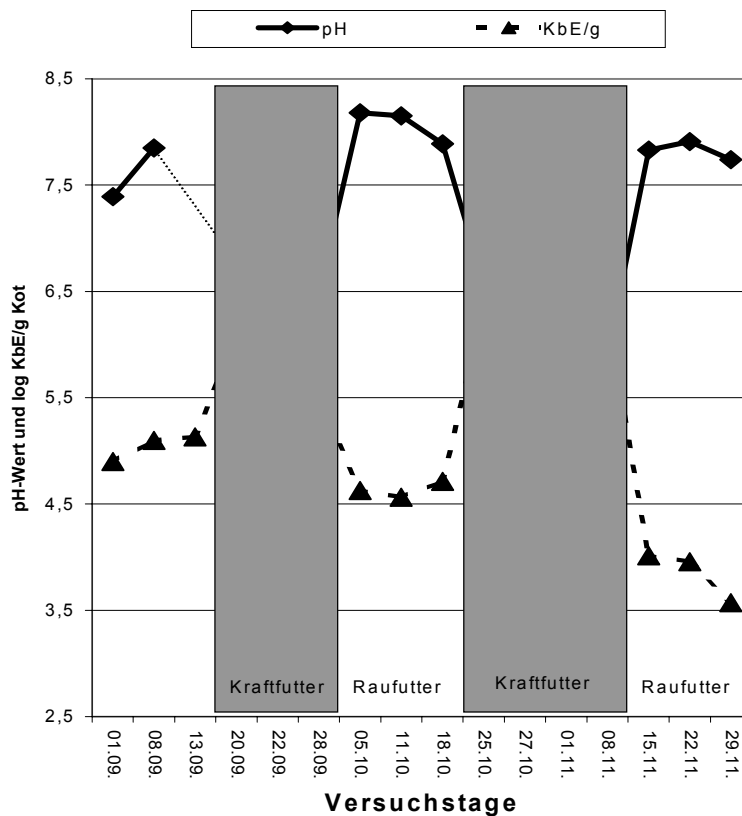
Säureschock) ermittelt. Aus 18 h -Anreicherungskulturen von unterschiedlichen Kotmengen (250 mg – 0,04 mg/ 5 ml mTSB + 50 ng Mitomycin C/ml) wurden mit Hilfe eines VT-ELISA die VTEC-Konzentrationen in den Kotproben festgestellt. Von Kotproben, die im VT-ELISA positiv reagiert hatten, wurden mit einem Kolonie-Immunoblot (Timm et al., 1996) VTEC-Isolate gewonnen, die hinsichtlich ihrer Säureresistenz überprüft wurden. Von diesen Isolaten wurden Schüttelkulturen in LB-Medium über Nacht bei +37°C angelegt. In den Kulturen wurden die LKZ auf MacConkey-Agar (KbE E.coli vor Säureschock) bestimmt. 0,1ml dieser Kulturen wurden mit 10ml LB-Medium, pH 2,5 für 1h bei +37°C inkubiert. Nach Neutralisation mit 1n NaOH auf ~pH 7,5 wurde erneut die LKZ-Bestimmung auf MacConkey-Agar (KbE E.coli nach Säureschock) durchgeführt.

Ergebnisse: Die Ergebnisse sind in den Abb. 1-4 zusammengefasst. Der mittlere pH-Wert der Kotsuspensionen lag bei der Raufuttermation (alleinige Heufütterung) signifikant um 1-2 pH-Einheiten höher als bei der Kraffuttermation (Maisschrotfütterung). Die mittleren logarithmischen E.coli-Konzentrationen verhielten sich während der unterschiedlichen Fütterungsperioden genau gegenläufig zu den pH-Werten (Abb.1). Bei Kraffuttergabe stieg die mittlere E. coli-Konzentration auf über 10^6 KbE/g Kot an, um bei Heufütterung auf Werte von $1 - 5 \times 10^4$ KbE/g Kot abzusinken. Die VTEC-Ausscheidung unterlag in Abhängigkeit von der Fütterung zyklischen Veränderungen. So nahm in der Regel nach jeder Futterumstellung die Zahl VTEC-positiver Tiere auffällig ab, um im Verlauf der 2-3-wöchigen unveränderten Fütterung wieder anzusteigen. Vor der 1. Futterumstellung auf Kraffutter konnten bei 9 - 6 der 10 Versuchstiere VTEC im Kot nachgewiesen werden, nach Beginn der Kraffuttergabe gelang das nur noch bei 2-3 Rindern. Im Verlauf dieser Fütterung traten VTEC wieder bei 6 Tieren auf. Die Umstellung der Fütterung auf Raufutter bewirkte wiederum eine Reduktion der VTEC-Ausscheider auf 3 Tiere, wonach sich am Ende dieser Fütterungsperiode die Anzahl wieder auf 6 VTEC-Ausscheider erhöhte. Nach Beginn der erneuten, nunmehr 3 Wochen dauernden Kraffutterfütterung konnten nur noch 2 Tiere als VTEC-positiv gefunden werden (Abb.2). Dieser Trend zur verminderten VTEC-Ausscheidung in Folge einer Futterumstellung war bei 2 Rindern, die nahezu über die gesamte Versuchszeit VTEC im Kot enthielten, deutlich zu quantifizieren (Abb. 3). Mit jedem Futterwechsel war eine Reduktion der VTEC-Konzentrationen verbunden. So war nach Umstellung auf Kraffutter trotz starkem Anstieg der E. coli-Zahl eine besonders deutliche Verminderung der VTEC-Konzentrationen zu beobachten. Alle Kotproben wurden einer Säureschockbehandlung unterworfen. Über den gesamten Versuchsverlauf wurden die vor Säurebehandlung beobachteten E. coli-Konzentrationen durch den Säureschock sowohl bei Rau- als auch bei Kraffutterfütterung bei den verschiedenen Tieren um 1 – 6 (meist um 3-4) log-Stufen reduziert (Abb. 4). VTEC waren in den Säure-behandelten Kotproben in keinem Falle mehr nachweisbar, selbst bei den höchsten gemessenen Ausgangskonzentrationen von $2,5 \times 10^4$ VTEC/ g Kot. Wurden jedoch die aus den Kotproben isolierten VTEC (n = 27) direkt dem Säureschock unterworfen, war ein KbE-Abfall von nur ~ 0,5 log-Stufen zu beobachten. Der Grad der Verminderung war auch hier völlig unabhängig von der jeweiligen Futterart zum Zeitpunkt der VTEC-Isolierung, d.h. die isolierten VTEC waren von Versuchsbeginn an weitgehend säureresistent. Für die hohe Säureelastizität der im Kot befindlichen VTEC im Unterschied zu den VTEC-Isolaten sind unter den gewählten Versuchsbedingungen vermutlich verschiedenste Kotbestandteile (Begleitflora, chemische Inhaltsstoffe usw.) verantwortlich.

Diskussion: Der von Diez-Gonzalez et al. (1998) beobachtete Einfluss der Fütterung auf die E. coli-Konzentration und den pH-Wert im Kot konnte von uns weitgehend bestätigt werden. Dagegen war die bei Getreidefütterung beschriebene 10^6 -fache größere Anzahl säureresistenter E. coli im Kot im Vergleich zur Heufütterung mit unseren Versuchen nicht nachzuweisen. Zwischen den unterschiedlichen Futtermationen einerseits und der von Tier zu Tier und von Probennahme zu Probennahme sehr stark variierenden Säureresistenz der E. coli im Kot andererseits war keinerlei Zusammenhang zu erkennen. Gleiches beobachteten Hovde et al. (1999) für E. coli O157:H7. Die VTEC-Isolate zeigten im Unterschied zu den im Kot

befindlichen VTEC über den gesamten Versuchszeitraum eine hohe in vitro Säureresistenz, die aber ebenfalls nicht durch das Fütterungsregime beeinflusst wurde. Besonders hervorzuheben ist, dass die VTEC-Ausscheidung innerhalb 1 Woche nach einer extremen Futterumstellung sich deutlich verringerte oder ganz aufhörte. Ähnliches haben Kudva et al. (1997) bei experimentell mit *E. coli* O157:H7 infizierten Schafen nach abruptem Futterwechsel von Heu auf Kraftfutter festgestellt. Um den Fütterungseinfluss auf die VTEC-Ausscheidung bei natürlich infizierten Rindern als Mittel zur Reduzierung des VTEC-Eintrags in die Lebensmittelkette nutzen zu können, bedarf es noch umfangreicher weiterer Untersuchungen.

Abb. 1: pH-Wert und *E. coli*-Konzentration im Kot in Abhängigkeit von der Fütterung



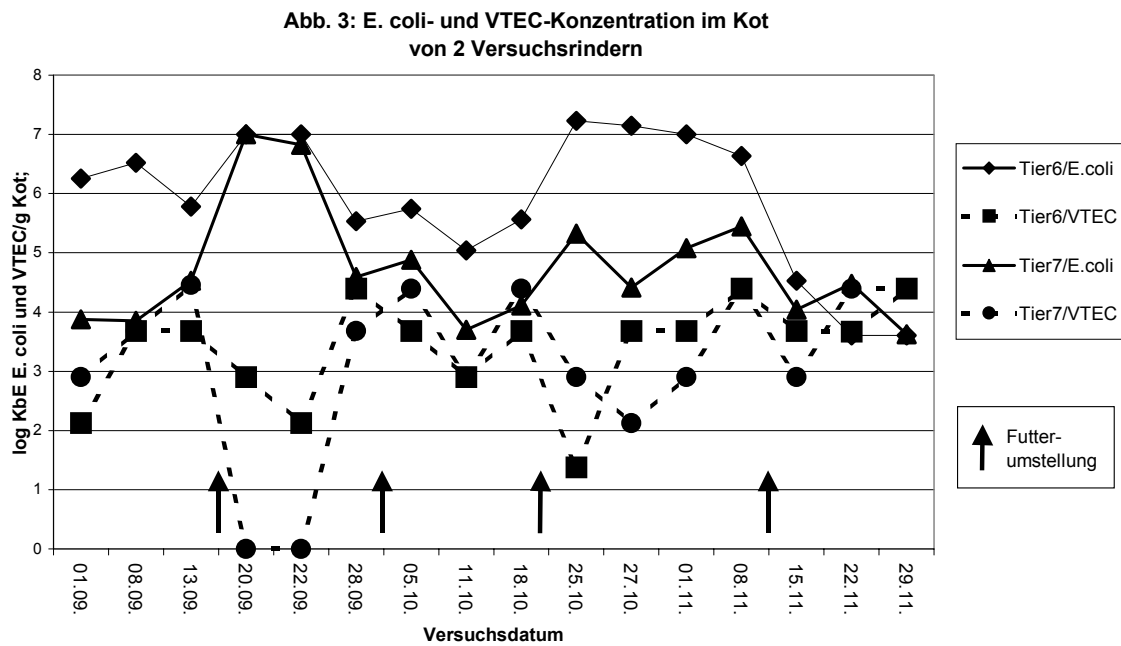
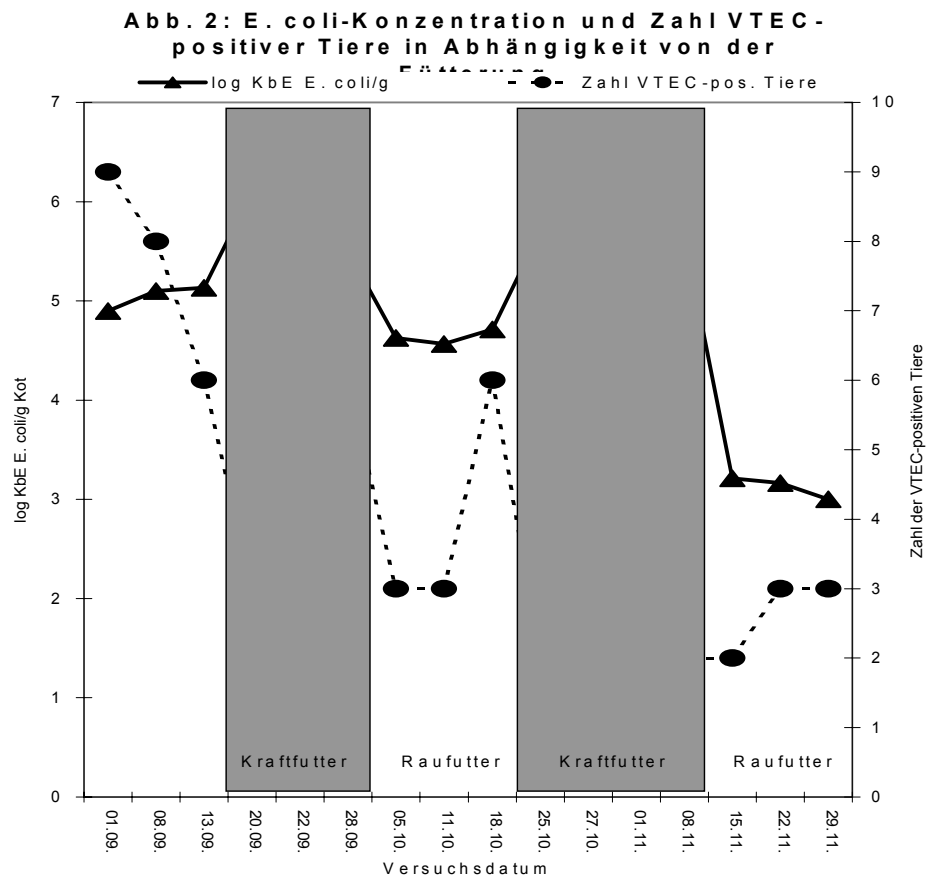
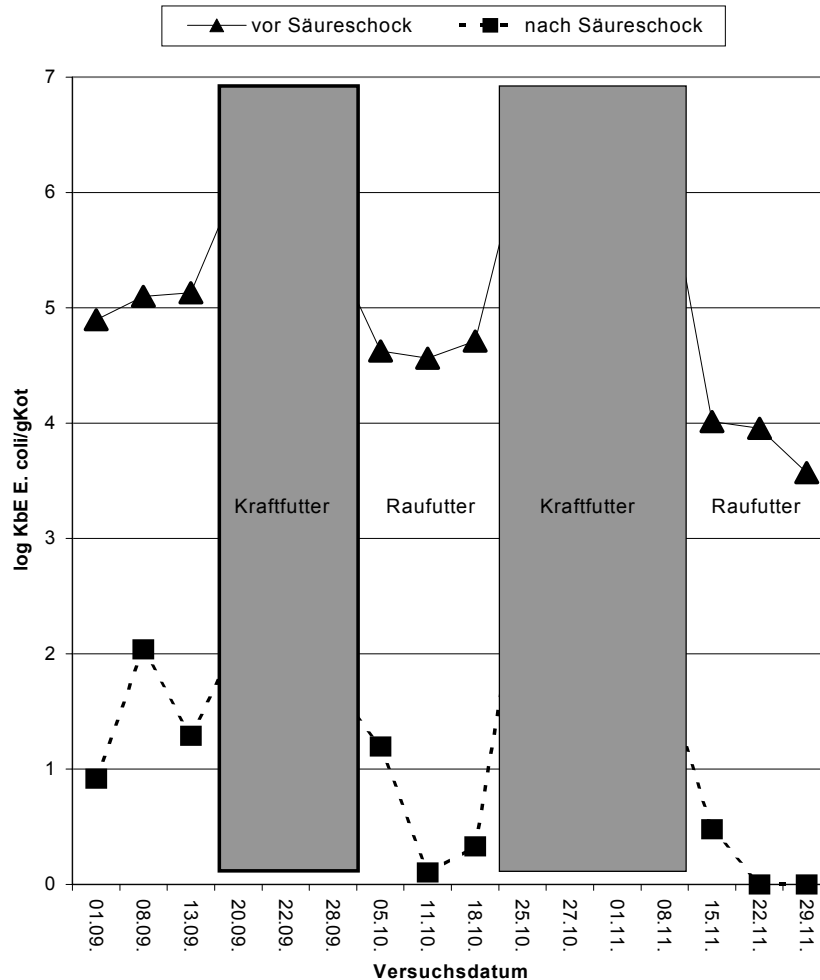


Abb. 4: Mittlere E.coli-Konzentration im Kot in Abhängigkeit von der Fütterung vor und nach Säureschock



Literaturverzeichnis:

Diez-Gonzalez, F., Callaway, T.R., Kizoulis, M.G., Russell, J.B. (1998). "Grain feeding and the dissemination of acid-resistant Escherichia coli from cattle." Science **281**: 1666-1668.

Hancock, D.D., Besser, T.E., Gill, C., Bohach, C.H.. (1999). "Cattle, hay, and E-coli." Science **284**(5411): 51-52.

Hovde, C.J., Austin, P.R., Cloud, K.A., Williams, C.J., Hunt, C.W. (1999). "Effect of cattle diet on Escherichia coli O157 : H7 acid resistance." Applied and Environmental Microbiology **65**(7): 3233-3235.

Kudva, I.T., Hunt, C.W., Williams, C.J., Nance, U.M., Hovde, C.J. (1997). "Evaluation of dietary influences on Escherichia coli O157:H7 shedding by sheep." Applied and Environmental Microbiology **63**(10): 3878-3886.

Timm, M., Klie, H., Richter, H., Perlberg, K.-W. (1996). "Eine Methode zur gezielten Isolierung Verotoxin-bildender Escherichia coli-Kolonien." Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **109**: 270-272.