

Shigatoxin-produzierende und enteropathogene *Escherichia coli* in getrockneten Kleinfischen von lokalen Märkten in Kenia



With support from
Federal Ministry of Food and Agriculture
by decision of the German Bundestag

Laura Wessels¹, André Göhler¹, Carolin Hobe¹, Cyprian Odoli², Felix Reich¹, Johannes Pucher¹

¹ Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland; ² Kenyan Marine and Fisheries Research Institute, Baringo, Kenya;

Einleitung

Rastrineobola argentea, umgangssprachlich auch Omena genannt, ist eine kleine pelagische Fischart aus dem Viktoriasee. Getrocknete Omena werden nicht nur in der Region um den Viktoriasee verkauft und konsumiert, sondern auch zu weiter entfernten Märkten transportiert. In Kenia werden Omena meist auf dem Boden liegenden Fischernetzen getrocknet (Abbildung 2A). Nachfolgende Schritte beinhalten Verpacken, Transport, Lagerung und Verkauf auf lokalen Märkten. Von dem Wasser in dem Omena lebt bis hin zum Verkauf auf dem Markt kann es zu einer mikrobiellen Kontamination kommen. Dazu gehört die Kontamination mit fäkal assoziierten Krankheitserregern wie Shigatoxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC) und anderen durchfallverursachenden *E. coli* (DEC) wie enteropathogenen *E. coli* (EPEC), enterotoxigenen *E. coli* (ETEC), sowie enteroaggregativen *E. coli* (EAggEC) und enteroinvasiven *E. coli* (EIEC). DEC sind in der Lage auch in trockener Umgebung zu überleben und können beim Menschen schwere Erkrankungen verursachen, wie STEC Ausbrüche durch Mehl eindrucksvoll gezeigt haben. Diese Studie wurde durchgeführt, um erste Erkenntnisse über das Vorhandensein von STEC und anderen DEC in getrockneten Omena auf kenianischen Märkten zu ermitteln.

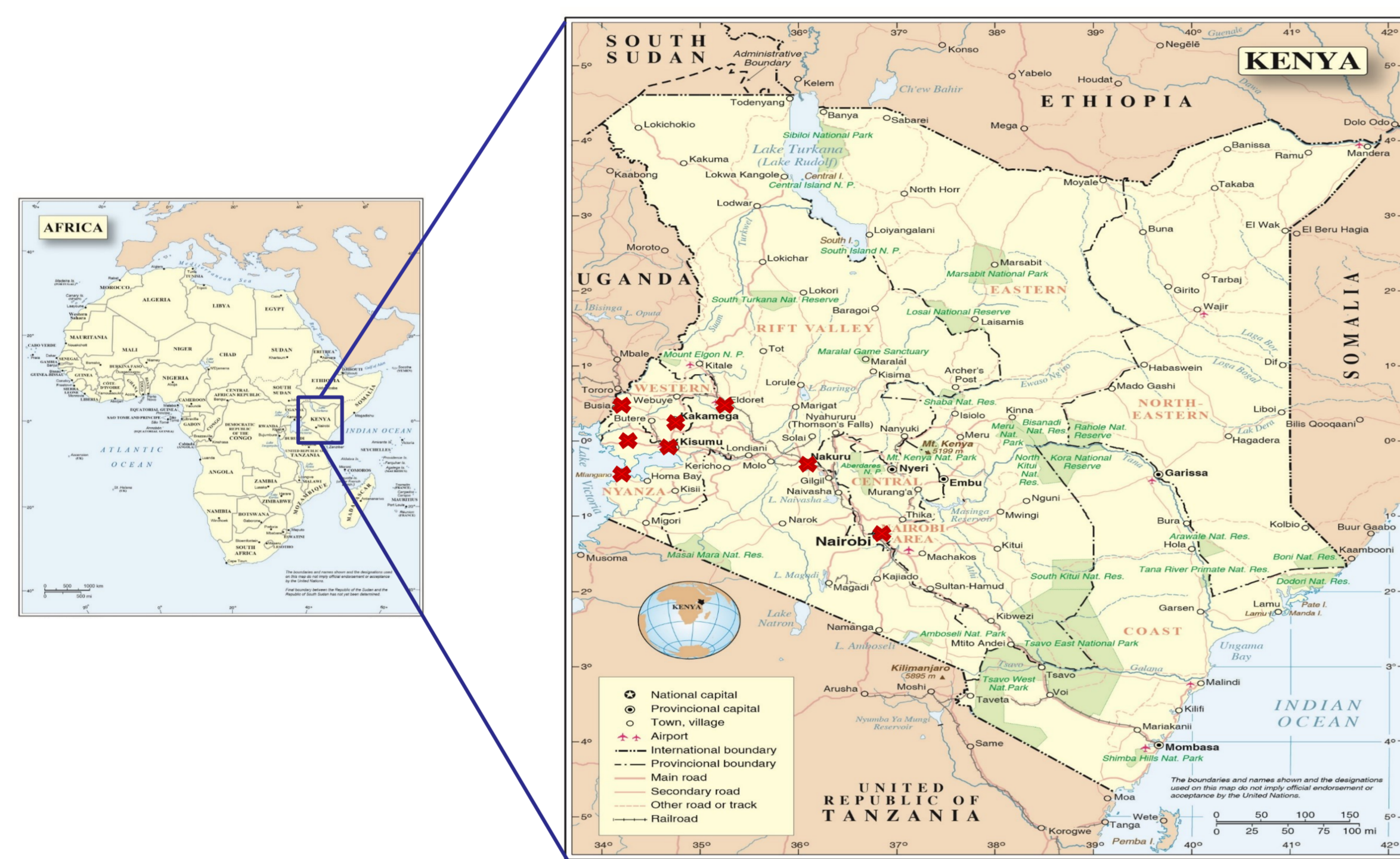


Abbildung 1: Probenahmeorte in Kenia (Karten basierend auf United Nations maps).

Material und Methoden

Auf acht lokalen Märkten in Kenia (Bondo, Busia, Eldoret, Kakamega, Kisumu, Mbita, Nakuru und Nairobi) wurden Proben gesammelt. Die Entfernungen der Märkte zum Viktoriasee unterschieden sich und reichte von Probenahmen direkt am See bis zu einer Entfernung von etwa 300 km (siehe Abbildung 1).

Von jedem Markt wurden jeweils fünf Marktstände beprobt und jeweils mindestens 100 g getrocknete Omena gekauft und per Luftfracht nach Deutschland transportiert. Insgesamt wurden 41 Proben genommen, da in Kisumu ein Marktstand mehr als eine Charge Omena verkaufte und diese separat voneinander beprobt wurden.

Alle Proben wurden direkt auf Anwesenheit von *E. coli* untersucht, STEC und DEC wurden gemäß ISO 13136:2012¹ und dem nationalen Protokoll ASU L 25.00-6 Okt. 2017, §64 LFGB² homogenisiert und angereichert (Abbildung 3) analysiert. Nach der Anreicherung in gep. Peptonwasser und Kultivierung auf TBX-Agar wurden Abschwemmungen hergestellt und weiter untersucht.

Die Proben nach Märkten gepoolt und anschließend mittels Realtime-PCR auf Shigatoxin-Gene (*stx1*, *stx2*) und Markergene für EPEC (Intimin: *eae*), ETEC (hitzelabile und hitzestabile Toxine: *lt*, *stp*, *sth*), EAggEC (*aggR*, *aaiC*) sowie EIEC (*ipaH*) gemäß ASU L 25.00-6, §64 LFGB² und den Methoden des europäischen Referenzlabors für *Escherichia coli*³⁻⁵ untersucht. Wenn die gepoolten Marktproben für eines der Gene *stx1*, *stx2* oder *eae* positiv waren, wurden die Proben von den Marktständen einzeln weiter auf das Vorhandensein von Shigatoxin-Genen und DEC-Markergenen untersucht.

Nachfolgend wurden Isolate von TBX-Agar gewonnen. Isolate, welche *stx1*, *stx2* oder *eae* Gene aufwiesen, wurden serotypisiert.

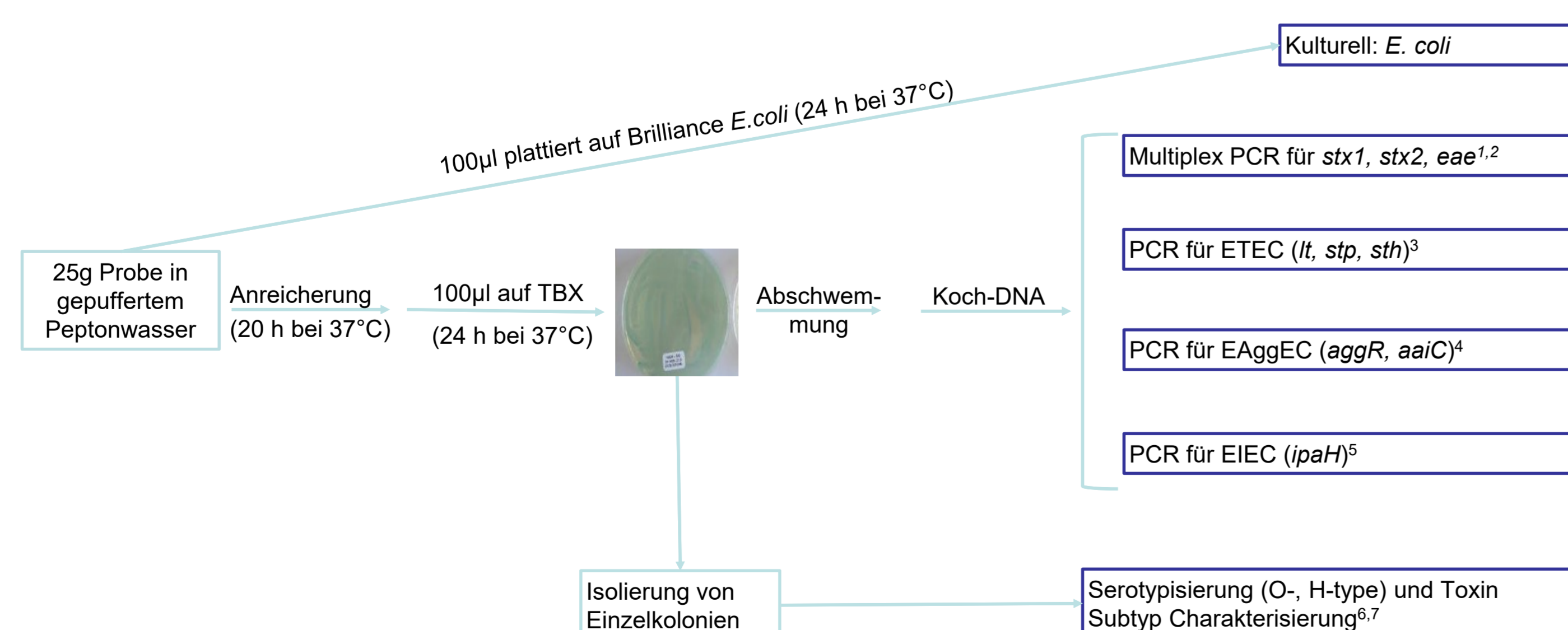


Abbildung 3: Verschiedene Schritte bei der Untersuchung von getrockneten Omena für den kulturellen Nachweis von *E. coli* und den molekularen Nachweis von STEC und EPEC nach ISO 13136:2012¹, dem nationalen Protokoll ASU L 25.00-6 Okt. 2017, § 64 LFGB² und Methoden des Europäischen Referenz Labors für *Escherichia coli*³⁻⁵.



Abbildung 2: A: Trocknen von *Rastrineobola argentea* (Omena) in der Sonne; B und C: Beispiele von Märkten.

Ergebnis und Diskussion

E. coli wurde kulturell in 29,3 % der Proben (12/41 Proben, siehe Tabelle 1) von sieben Märkten nachgewiesen. Gene für STEC oder andere DEC konnten in fünf der acht untersuchten Märkte nachgewiesen werden. Das Gen für *stx1* wurde in nur einer Marktstandprobe (2,4 %, n=41) und die Gene für *stx2* und *eae* in jeweils 9,8 % der Omena-Proben nachgewiesen. ETEC-Marker wurden in vier Proben (9,8%), EAggEC-Marker in zwei Proben (4,9%) und EIEC-Marker in keiner Probe gefunden.

Tabelle 1: Ergebnisse der kulturellen auf *E. coli* und molekularbiologischen Untersuchungen auf das Vorhandensein von *stx1*, *stx2*, *eae* (EPEC), *lt*, *stp*, *sth* (ETEC), *aggR*, *aaiC* (EAggEC), *ipaH* (EIEC) Genen.

	Kisumu	Mbita	Busia	Eldoret	Kakamega	Bondo	Nakuru	Nairobi
<i>E. coli</i> (kulturell)	+	+	+	+	+	-	+	+
	(2/6)	(1/5)	(2/5)	(3/5)	(2/5)	(0/5)	(1/5)	(1/5)
<i>stx1</i> (STEC)	+	-	-	-	-	-	-	-
	(1/6)	(0/5)	(0/5)	(0/5)	(5er Pool)	(5er Pool)	(5er Pool)	(0/5)
<i>stx2</i> (STEC)	+	-	+	+	-	-	-	-
	(1/6)	(0/5)	(2/5)	(1/5)	(5er Pool)	(5er Pool)	(5er Pool)	(0/5)
<i>eae</i> (EPEC)	-	+	-	+	-	-	-	+
	(0/6)	(1/5)	(0/5)	(2/5)	(5er Pool)	(5er Pool)	(5er Pool)	(1/5)
<i>lt</i>, <i>stp</i>, <i>sth</i> (ETEC)	+	-	+	+	-	-	-	-
	(1/6)	(0/5)	(2/5)	(1/5)	(5er Pool)	(5er Pool)	(5er Pool)	(0/5)
<i>aggR</i>, <i>aaiC</i> (EAggEC)	-	+	+	-	-	-	-	-
	(0/6)	(1/5)	(1/5)	(0/5)	(5er Pool)	(5er Pool)	(5er Pool)	(0/5)
<i>ipaH</i> (EIEC)	-	-	-	-	-	-	-	-
	(0/6)	(0/5)	(0/5)	(0/5)	(5er Pool)	(5er Pool)	(5er Pool)	(0/5)

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Serotypisierung der drei gewonnenen STEC-Isolate. Zwei Isolate, die aus derselben Probe in Kisumu stammten, gehörten zum Serotyp O149:H8 mit *stx2a*, welcher beim Menschen schwere Erkrankungen einschließlich des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) verursachen kann. Dieser STEC-Serotyp wurde zuvor auch bei Nutztieren gefunden. Ein weiteres Isolat wurde als O1777:H18 mit dem Toxin-Subtyp *stx2f* charakterisiert. Stämme mit dem Toxin-Subtyp *stx2f* wurden zuvor aus Nutztieren sowie aus dem Kot von Tauben und Wildwiederkäuern isoliert. Stämme dieses Subtyps wurden mit Durchfallerkrankungen in Verbindung gebracht, schwere Erkrankungen beim Menschen wurden bisher aber nicht dokumentiert.

Tabelle 2: Charakterisierung der drei *stx2* positiven *E. coli* Isolate.

	Serotyp	Toxin Subtyp	<i>ehxA</i>	<i>nleB</i>	<i>eae</i>	<i>lt</i> , <i>stp</i> , <i>sth</i>	<i>aggR</i> , <i>aaiC</i>	<i>ipaH</i>
Isolat 1 (Kisumu)	O149:H8	<i>stx2a</i>	+	-	-	-	-	-
Isolat 2 (Kisumu)	O149:H8	<i>stx2a</i>	-	-	-	-	-	-
Isolat 3 (Busia)	O1777*:H18	<i>stx2f</i>	-	-	-	-	-	-

Fazit

STEC und DEC konnten in getrockneten Omena von verschiedenen Märkten in Kenia nachgewiesen werden.

STEC-Isolate des gleichen Stereotyps wie die hier gefunden Isolate wurden in Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen nachgewiesen und können daher potenziell eine Gefahr für Konsumenten darstellen.

Die nachgewiesenen STEC-Isolate könnten ihren Ursprung in Nutztieren oder Wildvögeln haben, allerdings ist der genaue Eintragsweg nicht bekannt.

¹International Organization for Standardization. (2012). Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups (ISO Standard No. 13136:2012).
²Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. (2017). Untersuchung von Lebensmitteln - Qualitativer Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) in frischen pflanzlichen Lebensmitteln - Multiplex real-time PCR-Verfahren. (ASU L 25.00-6:2017-10, §64 LFGB).
³European Union Reference Laboratory for *Escherichia coli*. (2013). Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *lt*, *stx*, and *stx* genes, encoding the heat-labile and heat-stable enterotoxins. (EURL-VTEC Method 08, Rev 0).
⁴European Union Reference Laboratory for *Escherichia coli*. (2021). Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes. (EURL-VTEC Method 05, Rev 2).
⁵European Union Reference Laboratory for *Escherichia coli*. (2013). Detection of Enteroinvasive *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *ipaH* gene. (EURL-VTEC Method 07, Rev 0).
⁶Scheut, F., Teji, L. D., Butin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2951-2963.
⁷Orskov, F. and Orskov, I. (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*, 14, 43-112.