

4th Workshop on Microbial Systematics, Population Genetics and Epidemiology

Workshop der Fachgruppe „Mikrobielle Systematik, Populationsgenetik, Epidemiologie“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie

Die Fachgruppe „Mikrobielle Systematik, Populationsgenetik, Epidemiologie“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie führte ihren 4. Workshop vom 15.–16. November 2002 in Wernigerode durch (54 Teilnehmer). Schwerpunktthemen dieses Workshops waren Taxonomie, Subdifferenzierung, Populationsgenetik und Epidemiologie von hochpathogenen Krankheitskeimen, die als mögliche Biowaffen, insbesondere seit den Anschlägen mit Anthrax-sporenhaltigen Briefen in den USA, in den Mittelpunkt politischen und wissenschaftlichen Interesses gerückt sind.

Die Organisatoren Helmut Tschäpe, Alexander Rakin und Hermann Neubauer stellten ein umfangreiches und attraktives wissenschaftliches Programm zusammen, das fast nur aus Übersichtsvorträgen bestand, die von vielen nationalen und internationalen Experten aus Schweden, England, Frankreich, Österreich, der Schweiz, den Niederlanden und Deutschland getragen wurde. In der Einführung zum 4. Workshop (H. Tschäpe, Wernigerode) wurde betont, dass mit Ausnahme von einigen, insbesondere militärisch arbeitenden Labors die Forschung zur Biologie und Epidemiologie dieser bakteriellen und viralen Erregergruppen aufgrund der Biowaffenkonvention quasi tabuisiert war und daher wenig moderne Grundlagen bekannt geworden sind. Daher sollten die Übersichtsvorträge als Präsentation des „state of the art“ auch für die (bisher) nicht mit diesen Organismengruppen befassten Wissenschaftler zur Weiterbildung angesehen werden. Diese hochpathogenen,

bioterroristisch nutzbaren Erregergruppen umfassen meistens schon sehr lange bekannte Arten, deren Eradikation in den nördlichen Industriestaaten aber dazu führte, dass sie in medizinischen Forschungsprojekten unberücksichtigt bzw. vernachlässigt wurden. Das zeigte sich auch in der mangelnden technischen Ausrüstung vieler mikrobiologischer Institute (Sicherheitslabore der Stufe 3 und 4), deren Nachrüstung jetzt mit Hochdruck betrieben werden muss. Auch sind Forschungsprojekte zu weiterführenden molekularen Charakterisierungen zur Taxonomie, Diagnostik, Virulenz, Populationsdynamik und Infektionsepidemiologie nicht nur in der Bundesrepublik Deutschland zu gestalten, sondern europaweit durchzuführen. Deshalb sollte der 4. Workshop neben der Vermittlung des gegenwärtigen Kenntnisstandes auch dem Erfahrungsaustausch und der Knüpfung von Kontakten für zukünftige Forschungskooperationen dienen.

Bakterien

Bacillus anthracis

In 3 Vorträgen von E. Stackebrandt, Braunschweig, F. Allerberger, Innsbruck, und R. Böhm, Hohenheim, wurde die Taxonomie, Subdifferenzierung und Epidemiologie von *Bacillus anthracis* behandelt. *B. anthracis* ist ein Bakterium, das sich taxonomisch nicht wesentlich von anderen Bazillus-Arten wie *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* und *B. thuringiensis* unterscheidet, also eigentlich keine eigene Spezies dar-

stellt, lediglich eine „Variante“, die durch die Anwesenheit von 2 Virulenzplasmiden (horizontaler Gentransfer) charakterisiert ist. Diese Plasmide kodieren für die Toxine EF (Ödem-Faktor), LF (Letalfaktor) und PA-Faktor (protektives Antigen) bzw. für die Poly-D-Glutaminsäure-Kapsel. *B. anthracis* zeigt eine phylogenetisch und taxonomisch konservierte Speziesstruktur und weist damit auf eine evolutionär späte Entstehung hin. Diese Tatsache erschwert die Subdifferenzierung für epidemiologische Zwecke (s. weiter unten). In den nördlichen Industriestaaten ist *B. anthracis* eradiert, kommt aber noch in der Türkei, Äthiopien, im mittleren und südlichen Afrika und besonders in China und Indien vor. Epidemiologisch kann man einen „natürlichen“ epidemischen Prozess von einem „industriellen“ und einem „bioterroristischen“ epidemischen Prozess der Anthrax-Infektionen unterscheiden. Der natürliche epidemische Prozess geht stets von infizierten Tieren aus (es gibt unterschiedlich empfindliche Tierspezies) und verursacht menschliche Infektionen (Hautmilzbrand 85%, Darmmilzbrand 4%, Lungenmilzbrand 1% in Endemiegebieten) eher als „Nebeneffekt“ der Tier-zu-Tier-Verbreitung (gelegentlich auch über kontaminierte Umwelthabitate). Der

© Springer-Verlag 2003

Prof. Dr. Helmut Tschäpe
Leiter des Nationalen Referenzzentrums
für Salmonellen und andere Enteritiserreger,
Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode,
Nordufer 20, 13353 Berlin
E-Mail: Tschäpeh@rki.de

industriell-epidemische Prozess, der durch kontaminierte tierische Produkte wie Haare, Wolle, Leder bedingt ist und den Menschen im Prozess der Verarbeitung dieser Produkte erfasst, wird weit streuend auch außerhalb der Endemiegebiete wirksam. Schließlich ist der bioterroristisch-epidemische Prozess, wie er in den USA durch die Versendung von bakteriellen Sporen in Briefen vorkam, zu nennen. Bei den 3 verschiedenen epidemischen Prozessen ist die infektiöse Dosis eine kritische Größe und bleibt weitgehend strittig. Da die Anthrax-Sporen als infektiöses Agens weitgehend die Infektion bedingen, die Sporen aber in der Regel im Zellverband verbleiben, müssen sie zur Erhöhung der Infektiosität aus dem Verband herausgelöst werden, um dann in sehr viel geringerer Dosis einen Lungenmilzbrand auslösen können.

Yersinia pestis

In 2 Vorträgen von A. Rakin, München, und M. Achtman, Berlin, wurden Übersichten zum Kenntnisstand der Populationsstruktur, der Virulenz und der Subdifferenzierung von *Yersinia pestis* gegeben. Ähnlich wie *B. anthracis* gilt auch *Y. pestis* als eine relativ neu (2.000–15.000 Jahre) entstandene Variante anderer *Yersinia*-Spezies (*Y. pseudotuberculosis*). *Y. pestis* ist durch 3 Virulenzplasmide charakterisiert, die für zahlreiche Virulenzfaktoren kodieren. Hierzu zählen z. B. das Fra1-Antigen, der Pestizin-Rezeptor, ein Typ-III-Sekretionssystem und Effektoren, sowie eine Phospholipase Ymt. Einige dieser Faktoren sind nur für den „Nagerzyklus“ oder den „Flohzyklus“ wichtig und spielen somit für die humane Pathogenität keine Rolle (z. B. koaguliert das Ymt-Protein das Blut, wobei durch Verstopfen des Ventrikulums des Flohs seine Stechfrequenz und damit die Übertragung von *Y. pestis* erhöht wird). Mithilfe der Identifizierung der IS100-Insertionsstellen ließ sich zeigen, dass der Biovar Antiqua aus 2 verschiedenen phylogenetischen Gruppen besteht, während die anderen Biovare (*Orientalis* und *Medievalis*) eigenständige Subgruppen von *Y. pestis* darstellen. Die unter dem Namen *Y. pestoides* zusammengefassten Varianten (*causasia*, *hissarica*, *ulegeica*, *altaica*) mit z. T. fehlenden Virulenzfaktoren stehen nicht am Anfang der evolu-

tionären Entwicklung von *Y. pestis*, sondern stellen geographische „Abarten“ der Spezies dar. *Y. pestis* ist als Waldpest weltweit – besonders in Südostasien, Madagaskar und den USA – verbreitet. Eine epidemiologische Wiederbelebung der pandemischen Pest (vergleichbar zu den 3 pandemischen Pestzügen im 5., 14. und 19. Jahrhundert) hängt weitgehend auch von Veränderungen in der Ökologie der betreffenden Nagerpopulation und der dort verbreiteten Flohpopulation ab. Zusätzlich können durch den horizontalen Gentransfer andere bzw. neue Plasmide in der *Y.-pestis*-Gruppe auftreten, die zu Veränderungen in der Virulenz und Persistenz führen können. Die sehr niedrige Infektionsdosis von *Y. pestis*, insbesondere bei seiner Übertragung durch Aerosole, die die tödlich verlaufende Lungenpest auslösen kann, macht diesen Erreger als potenzielle Biowaffe außerordentlich gefährlich.

Francisella tularensis

A. Sjöstedt, Umea, Schweden, berichtete, dass auch *Francisella tularensis* phylogenetisch eine evolutionär relativ junge und konservierte Erregerspezies ist, die zu einer eigenen Familie gehört und sich in wenige Subspezies und Biovare aufteilt. Die Subspezies *F. tularensis* ist besonders virulent für den Menschen. Der Erreger kommt in vielen Ländern der nördlichen Hemisphäre vor und wird durch Zecken und andere Blut saugende Insekten übertragen. Eine Übertragung durch Staub ist ebenfalls häufig. Da bisher nicht viel über Virulenzfaktoren von *F. tularensis* bekannt ist (niedrige Infektionsdosis, intrazelluläre fakultative Lebensweise), sind durch die vollständige Sequenzierung des Genoms (Größe ca. 1,9 Mb) neue Einsichten in das Pathogenitätsmuster zu erwarten. Die niedrige Infektionsdosis und die ausgeprägte Persistenz in Umwelthabitaten (Wasser, Staub, Erde) macht *F. tularensis* zu einem Erreger, der potenziell in Biowaffen eingesetzt werden könnte. Die phylogenetisch homogene Struktur von *F. tularensis* zeigt sich auch in der fehlenden Möglichkeit, mit klassischen Subdifferenzierungsmethoden epidemiologische Zusammenhänge aufzuarbeiten. Dies ist gegenwärtig nur mit der MLVA (Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis, s. weiter unten) möglich.

Burkholderia pseudomallei

In 2 Übersichten von H. Neubauer, München, und T.L. Pitt, London, wurden die Phylogenie, die Virulenz und Epidemiologie von *Burkholderia pseudomallei* dargestellt. Dessen „klonaler Verwandter“ *B. mallei* blieb während des 4. Workshops allerdings unberücksichtigt. Im Gegensatz zu den anderen hochpathogenen Bakterien handelt es sich bei *B. pseudomallei* um einen Umweltkeim, der sein natürliches Habitat im Boden und Wasser hat. *B. pseudomallei* kommt endemisch in Südostasien und Nordaustralien vor und gehört taxonomisch zu einer Gruppe eng verwandter *Burkholderia*-Spezies wie die apathogenen *B. thailandensis* und *B. cepacia*.

B. pseudomallei ist phylogenetisch eine diverse Spezies, die mithilfe von Ribotyping, Pulse-Field-Gel-Elektrophorese (PFGE), IS-Typisierung gut definiert werden kann [Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST) ist zu wenig diskriminatorisch]. Durch Kontakt mit Boden- und Wasserhabitaten in Endemiegebieten kann es zu schwerwiegenden Infektionen beim Menschen kommen. Die Bakterien können über längere Zeit unbekannt im Menschen persistieren und dann schwer behandelbare chronische Krankheitsbilder auslösen. Durch die hohe Umweltstabilität und die niedrige Infektionsdosis sind *B. pseudomallei* mögliche Biowaffen-Erreger.

Coxiella burnetii und Brucella spp.

In 2 Übersichtsvorträgen von S. Baljer, Gießen, und S. Cutler, Weybridge, England, wurde der Kenntnisstand zu Infektionen mit *Coxiella burnetii* und *Brucella* spp. zusammengetragen. Beide Erreger lösen zwar auch schwerwiegende Infektionen beim Menschen aus, verbreiten sich aber vorwiegend zoonotisch innerhalb empfänglicher Tierpopulationen und sorgen für erhebliche Verluste in der Landwirtschaft. Daher könnten diese beiden Keime verwendet werden, um landwirtschaftliche Ressourcen zu vernichten, was in der Vergangenheit auch bereits geschehen ist.

C. burnetii (G. Baljer) ist phylogenetisch mit Legionellen verwandt und zeigt auch eine große Biodiversität. Allerdings ist das Virulenzplasmid von *C. burnetii* konserviert. Die Bakterien kommen weltweit vor und sind in ver-

schiedenen Tierarten endemisch. Die Übertragung auf landwirtschaftlich genutzte Tiere erfolgt aus infizierten Umwelthabitaten (hohe Umweltpersistenz). Die Verbreitung von *C. burnetii* erfolgt durch Aerosole oder auch durch Arthropoden. Die Infektionen des Menschen erfolgen meist über den aerogenen Weg. *C. burnetii* ist in Wildtier-Populationen verbreitet (auch in Deutschland gibt es Endemiegebiete) und wird von diesen auf Nutztiere übertragen. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung erfolgt nicht.

Die *Brucella*-abortus-, -melitensis-, -suis-Gruppe ist taxonomisch und phylogenetisch eine sehr diverse Gruppe, die bei verschiedenen Tierarten (auch bei Wassertieren, wie z. B. Robben) vorkommt. Diese Bakterien besitzen zwei Chromosomen (Größe je ca. 2 Mbp), wobei eines die sog. „house keeping“ und Spezies-spezifischen Gene trägt, das andere kodiert hingegen die „zusätzlichen“ Faktoren für Virulenz und Persistenz (Letzteres ist dem *Rhizobium*-Plasmid sehr verwandt und enthält auch Transferegene). Alle *Brucella*-Spezies können intrazellulär (in Makrophagen) sehr lange persistieren und so chronische und langwierige Infektionen hervorrufen. Die dafür nötigen Pathogenitätsdeterminanten sind nicht bekannt. Man weiß aber, dass sie ein den Agrobakterien ähnliches Typ-IV-Sekretionssystem für ihre Kommunikation mit der Wirtszelle benutzen. Nach vollständiger Sequenzierung des Genoms ist zu erwarten, dass weitere Virulenzfaktoren identifiziert werden. Die Subdifferenzierung der Stämme ist mithilfe der PFGE-, IS- und Mikrosatelliten-Typisierung sehr gut möglich.

Methodische Aspekte

Da die meisten der oben genannten Bakterien phylogenetisch sehr jung sind, zeichnen sie sich durch eine geringe Biodiversität aus. Daher sind Subdifferenzierungsmethoden wie PFGE, Ribotypisierung etc. nicht sensibel genug. In den letzten Jahren hat sich zur Subdifferenzierung aber die Analyse des Polymorphismus der Mikrosatelliten bzw. Minisatelliten als weitgehend hilfreich erwiesen. Gilles Vergnaud, Paris, fasste den Stand zur Analyse der Mikrosatelliten (1–6 Bp tandem repeats) bzw. Minisatelliten (tandem repeats mit über 15–50 Bp, auch als VNTR bezeichnet) für *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis*, *B. mallei* zusammen. Tandem repeats sind im Genom mit unterschiedlichen Polymorphismen verteilt und lassen sich mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfassen. Die Analyse des Polymorphismus unterschiedlicher tandem repeats ergibt die MLVA (Multilocus-VNTR-Analyse). Diese können in Datenbanken eingelesen und weltweit verwendet werden. Eine solche Datenbank befindet sich bereits im Aufbau und könnte im Rahmen einer internationalen Kooperation weiter ausgebaut werden. Die Verwendung der MLVA für eine epidemiologische Subdifferenzierung betrifft nicht nur Bakterienspezies mit geringer Biodiversität, sondern kann auch für andere Bakterienspezies wie Legionellen, Mikrobakterien, Neisserien, Salmonellen angewendet werden.

Viren

Zur Thematik der viralen Erreger, die eine hohe Pathogenität und Übertragbarkeit zeigen und die bioterroristisch verwendet werden könnten, wurden Übersichtsvorträge von H. Meyer, München, und H. Schmitz, Hamburg, zur Epidemiologie der Orthopoxviren und zur Epidemiologie der hämorrhagischen Fiebertypen präsentiert.

Die Orthopoxviren umfassen morphologisch und genetisch eine Gruppe genetisch ähnlicher Viren, die bei Menschen und Tieren schwere Infektionen erzeugen. Hierzu zählen die Pockenviren des Menschen, die Affenpocken-Viren, die Kuhpocken-Viren und die Kamelpocken-Viren. Während die humanen Pockenviren ausschließlich an den Menschen adaptiert und hochvirulent sind, erzeugen die anderen Pockenviren beim Menschen nur abgeschwächte klinische Bilder. Ihre hohe Biodiversität lässt sich durch Sequenzvergleiche erfassen.

Im Gegensatz zu den Orthopoxviren gehören die hämorrhagischen Fiebertypen (VHF) zu einer Vielzahl genetisch sehr verschiedener Virusgruppen wie das Krim-Kongo-Fieber, der Lassa-virus, das Ebolavirus etc., die jeweils dasselbe klinische Bild zeigen (fiebrige Allgemeinkrankheiten mit Zerstörungen der Blutkapillaren etc.). Für diese Virusgruppen fehlen hinsichtlich ihrer Infektionsquellen und Epidemiologie, aber auch hinsichtlich ihrer Infektiosität und Virulenz verlässliche Fakten, sodass die Durchführung diesbezüglicher Forschungsvorhaben unbedingt notwendig sind. Mithilfe einer integrierten Real-time-PCR kann man gegenwärtig alle vorkommenden VHF in kurzer Zeit identifizieren, was für epidemiologische Gegenmaßnahmen und Therapie von großer Bedeutung ist.

Der Workshop wurde mit 3 Kurzvorträgen zur Schnelldiagnostik von *B. anthracis* (R. Reissbrodt, Wernigerode; R. Söller, Hamburg; W. Beyer, Hohenheim) sowie einem Beitrag zur Pathogenese von Klebsiellen beendet.