©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Schriften Verein zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse 147 (2009): 77–90

Vibrio cholerae im Neusiedler See: Ein Grund zur Beunruhigung?

Alexander Kirschner, Andreas Farnleitner, Alois Herzig & Regina Sommer

Das Bakterium *Vibrio cholerae* ist sowohl Auslöser der Cholera und anderer Infektionskrankheiten als auch natürlicher Bestandteil der Bakteriengemeinschaft in bestimmten, meist leicht salzhaltigen Oberflächengewässern. Im Jahr 2001 wurden das erste Mal Ohrenentzündungen bei Freizeitgästen am Neusiedler See diagnostiziert, die auf Infektion durch *V. cholerae* zurückzuführen waren. Im Jahr 2005 kam es bei einem Risikopatienten sogar zu einer letalen Blutvergiftung. Diese Vorfälle waren Anlass, Vorkommen und potenzielle Pathogenität von *V. cholerae* im Neusiedler See näher zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit fasst die wichtigsten Ergebnisse der in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen zusammen und unternimmt eine Abschätzung des Risikos, an einer durch *V. cholerae* ausgelösten Infektion zu erkranken.

Alexander Kirschner A., Farnleitner A., Herzig A. & Sommer R., 2010: ***Vibrio cholerae* in the Lake Neusiedler See: A public health threat?**

The bacterium *Vibrio cholerae*, the pathogenic agent for cholera and other infectious diseases, also occurs naturally within organismic communities of certain slightly saline surface waters. For the first time in 2001, some visitors to the Neusiedler See were diagnosed with otitis, which was caused by infections with *Vibrio cholerae.* In 2005, a risk patient even died from blood poisoning. These incidents were the impetus to more closely investigate the potential pathogenicity of *Vibrio cholerae* in the Neusiedler See. This paper summarizes the most important results of the investigations carried out over the past years and provides a risk assessment for *Vibrio cholerae.*

Keywords: infection *Vibrio cholerae*, Lake Neusiedlersee, otitis, risk assessment.

Einleitung

Das Bakterium *Vibrio cholerae* ist Auslöser der Cholera, einer verheerenden Durchfallserkrankung, die nach wie vor eine der bedeutendsten durch Wasser übertragenen Infektionskrankheiten ist. Der Erreger wurde 1854 von einem italienischen Anatom namens Filippo Pacini entdeckt und 1883 von Robert Koch erstmals isoliert und beschrieben. Bei dem Bakterium handelt es sich um ein Gram negatives, gekrümmtes Stäbchen mit einer polaren Geisel (Abb. 1). Seit Beginn des 19. Jahrhunderts sind sieben weltweite Cholera-Pandemien ausgehend vom indischen Subkontinent registriert worden, wobei die letzte bis heute anhält, mit Schwerpunkten der Verbreitung in Südamerika und Afrika. Da Cholera-Epidemien immer mit der Übertragung durch kontaminiertes Wasser, in den überwiegenden Fällen Trinkwasser, verbunden sind, kommt die Krankheit heutzutage fast ausschließlich in Ländern mit schlechter Trinkwasserversorgung und niedrigen hygienischen Standards vor. Menschen in Industrieländern sind meistens nur durch den Import der Krankheitserreger bei Aufenthalten in betroffenen Pandemie-Gebieten betroffen. Abb. 2 zeigt eine Aufstellung von in Europa gemeldeten Fällen von Cholera im Zeitraum 1997–2008. Mit Ausnahme von Russland und der Ukraine wurden in Europa keine endemischen Fälle von Cholera beobachtet, die Anzahl der Fälle ist im Vergleich zu anderen Gebieten in Asien, Afrika und Südamerika aber gering. In diesen Erdteilen beträgt die Anzahl der Erkrankungen pro Jahr regelmäßig ein- bis dreihunderttausend (WHO 1996–2008). Die Letalität beträgt meistens um die 2–3 %, bei schlechter gesundheitlicher Versorgung bis zu 10 %.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

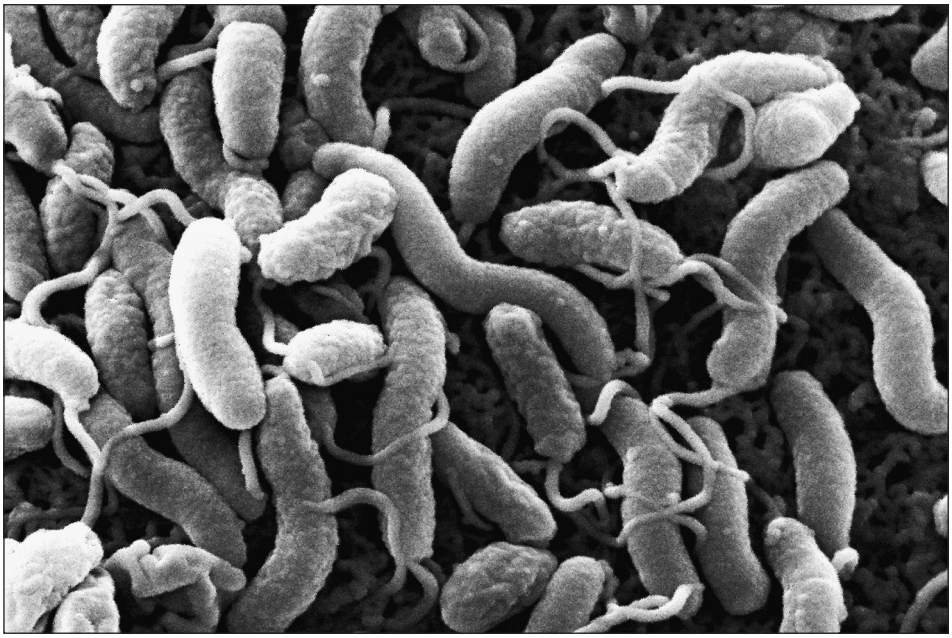

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *V. cholerae* Bakterien aus dem Neusiedler See. Deutlich zu erkennen ist die polare Geisel. (Bild aufgenommen von Dr. Susanne RICHTER, AGES). – Fig. 1: Scanning electron micrograph of *V. cholerae* from Lake Neusiedlersee. The polar flagellum is clearly visible.

Derzeit sind von *V. cholerae* mehr als 200 Serogruppen bekannt, von denen aber nur zwei (O1 und O139) Cholera auslösen können. Stämme dieser beiden Serogruppen besitzen diejenigen Virulenzfaktoren, die für eine Krankheitsauslösung unerlässlich sind. Darunter fallen einerseits das CTX-Gen (Cholera Toxin-Gen) und andererseits das auf der sogenannten Vibrio-Pathogenitätsinsel (VPI) lokalisierten TCP-Gen (Toxin coregulierter Pilus-Gen). Interessanterweise ist das CTX-Gen auf einem Bakteriophagen codiert, ein Virus, das das Bakterium erst befallen muss, bevor es zur Expression des Toxins durch das Bakterium kommen kann. Dieses Virus integriert in das Genom des Bakteriums, ohne das Bakterium dabei zu zerstören. Der toxin-coregulierte Pilus hat zwei Aufgaben. Einerseits ist ohne sein Vorhandensein die Anheftung des CTX-Bakteriophagen an das Bakterium nicht möglich, andererseits dient er zur Anheftung des Bakteriums an die menschlichen Darmzellen, ohne die das Toxin nicht seine verheerende Wirkung entfalten kann. Nicht O1/nicht O139 *V. cholerae* Bakterien besitzen diese Gene nicht, sind aber im Besitz anderer Virulenzfaktoren, wie Hämolysin, akzessorisches Enterotoxin, Zonula occludens Toxin, welche zu erheblichen Krankheiten führen können. Häufig beschrieben wurden Ohrenentzündungen, Durchfallserkrankungen, Wundentzündungen und Blutvergiftungen (MORRIS 1990, CHEASTY et al. 1999). Auch in Österreich wurden in den letzten Jahren vereinzelt Cholera-Fälle gemeldet, die jedoch alle importiert waren (WHO 1996–2008). Im Gegensatz dazu wurden seit 2001 mehrere Fälle von Ohrenentzündungen registriert, die auf Freizeitaufenthalte am Neusiedler See zurückzuführen waren. Zudem wurde auch ein Fall einer tödlichen Blutvergiftung bei einem Hobby-Fischer unter Chemotherapie diagnostiziert (HUHULESCU & al. 2007). All diese Fälle wurden aufgrund der Krankheitsgeschichte

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

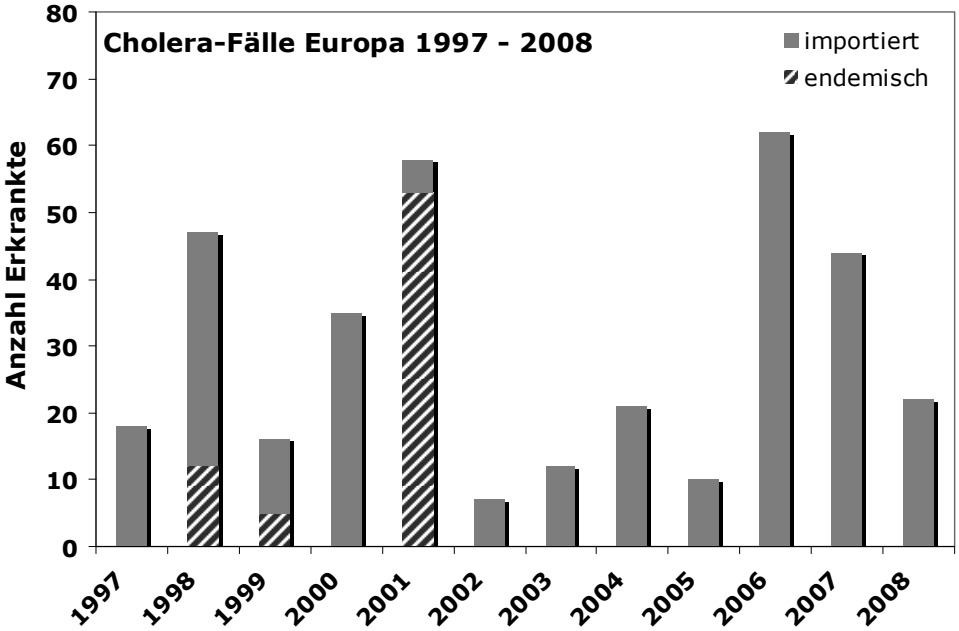

Abb. 2: Cholera Fälle in Europa. Der überwiegende Teil ist auf Import aus außereuropäischen Gebieten zurückzuführen. – Fig. 2: Cases of cholera infections in Europe. Most of the cases are attributed to an import from outside Europe.

auf im Neusiedler See vorkommende, endemische *V. cholerae* nicht O1/nicht O139 Stämme zurückgeführt.

Die Frage, die sich in diesem Zusammenhang nun aufdrängt, ist natürlich, wie die *V. cholerae* Bakterien in den See gelangen. In den meisten Fällen werden Krankheitserreger im Wasser über die fäkal orale Route – das heißt von fäkalen Ausscheidungen von Menschen oder Tieren über die Aufnahme über den Mund – übertragen, wobei sich diese Krankheitserreger im Säugetierdarm bei geeigneten Nährstoff- und Temperaturbedingungen optimal vermehren. *V. cholerae* besitzt aber neben seiner ökologischen Nische im menschlichen Darm die Fähigkeit, sich in Oberflächengewässern zu vermehren und wachsen zu können (Colwell et al. 1977) – im Gegensatz zu Fäkalbakterien und fast allen fäkal-oral übertragenen Krankheitserregern (Abb. 3). Prinzipiell ist *V. cholerae* in Gewässern aber den gleichen limitierenden Stressfaktoren ausgesetzt wie alle anderen Bakterien, das sind Fraß durch Protozoen (Grazing) bzw. Metazoen, Lyse durch Viren (Bakteriophagen), Nährstoffmangel, UV-Strahlung, ungünstige Temperatur oder Salinitätsverhältnisse, um die wichtigsten zu nennen. So besiedelt *V. cholerae* in Gewässern besondere Nischen, über die im Fall von O1/O139 Stämmen einiges, im Fall von nicht O1/nicht O139 Stämmen eher wenig bekannt ist. So wurde berichtet, dass ein Salzgehalt im Bereich von 0.2–1.4% („Brackwasser“) sowie ein relativ hoher pH-Wert zwischen 8.0–8.9 für das Wachstum von *V. cholerae* ideal sind, Bedingungen, wie sie im Neusiedler See vorherrschen. In Bezug auf Temperatur ist bekannt, dass *V. cholerae* unter einem Bereich von 10–15 °C und den damit oft verbundenen schlechteren Nährstoffbedingungen in den sogenannten VBNC (viable but non culturable) Zustand übergeht und somit mit Kultivierungsverfahren nicht mehr zu detektieren ist (Colwell et al. 1985). Bestimmte Stämme (vor allem O1 Stämme!) sind auch bei höheren Temperaturen und guten Nähr-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

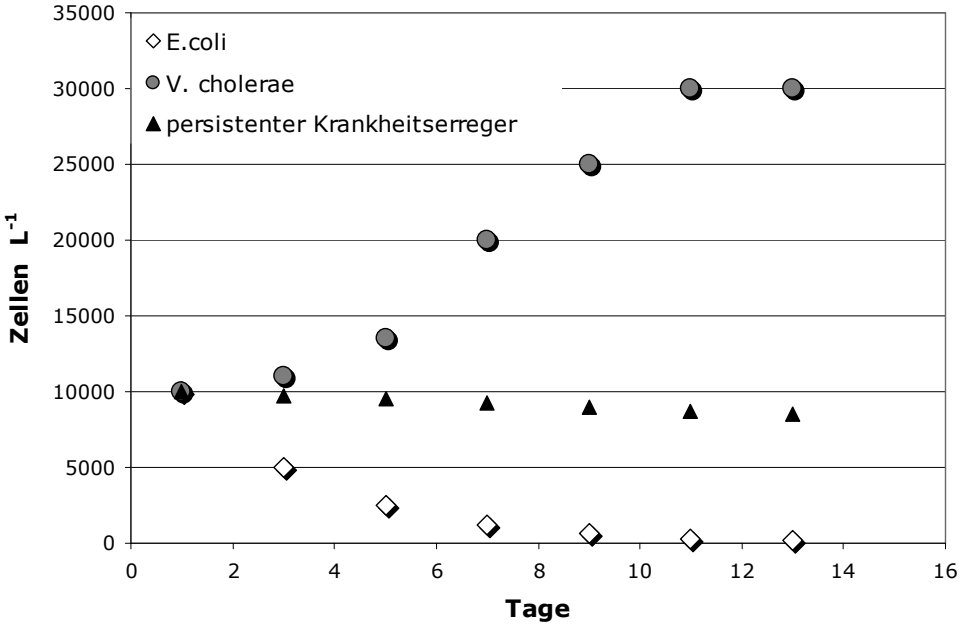

Abb. 3: Schematische Darstellung der Überlebenscharakteristik in Wasser von Fäkalindikatoren (z. B. *Escherichia coli*) und persistenten Krankheitserregern die über die fäkal-orale Route übertragen werden, im Vergleich zu *V. cholerae*. – Fig. 3: Schematic representation of the survival characteristics in water of fecal indicators (e.g. *Escherichia coli*) and persistent disease agents that are communicable via the fecal-oral route, and comparison with V. *cholerae*.

stoffbedingungen nur sehr schwer zu kultivieren. Neben den abiotischen Einflussfaktoren ist für die Verbreitung von *V. cholerae* O1 vor allem die Assoziation mit Zooplanktonorganismen, allen voran Copepoden, verantwortlich (HUQ et al. 1983). Häufig wurde *V. cholerae* auch auf Oberflächen von Algen bei Phytoplanktonblüten (ISLAM et al. 2004), auf Wasserpflanzen (ISLAM et al. 1994) und auf dem „Laich" (Eimassen) von Chironomiden (BROZA & HALPERN 2004) gefunden. Entscheidend ist, dass *V. cholerae* Biofilme auf Oberflächen von Substanzen bildet und diese Substanzen mittels Enzymen abbauen und als Nahrungsquelle nutzen kann, wie das Chitin der Copepoden (mittels Chitinase) oder den Mucus von Algen (mittels Mucinase).

Fragestellungen und Untersuchungsziele

Im Hinblick auf den Neusiedler See waren nun in den vergangenen Jahren folgende Fragen primär im Vordergrund, einerseits um das potenzielle Risiko für die menschliche Gesundheit abschätzen zu können, andererseits um die ökologische(n) Nische(n) von *V. cholerae* im See zu definieren.

(i) Wie sieht das saisonale Auftreten im See von *V. cholerae* aus? Besteht ein Zusammenhang mit bestimmten Umweltparametern?

(ii) Welche Stämme mit welchem Virulenzpotenzial kommen im See vor? Können auch Vertreter der Serogruppen O1 oder O139 isoliert werden?

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

(iii) Welche ökologische Nische besetzt *V. cholerae* im Neusiedler See? Wachsen sie planktisch oder in Assoziation mit bestimmten Zooplankton-Organismen?

(iv) Wie hoch ist die Gefahr der Invasion von Cholera-auslösenden O1/O139 Stämmen im See, die z.B. durch Menschen oder Vögel eingeschleppt werden könnten?

Methoden der Detektion von *Vibrio cholerae*

Um *V. cholerae* in Wasserproben und Biofilmen zu detektieren, wurde einerseits ein klassisches Kultivierungsverfahren auf einem Selektivagar (TCBS: Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose) nach Anreicherung in alkalinem Pepton Wasser (APW) angewendet, wobei die isolierten Kolonien noch biochemisch und molekularbiologisch mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) als *V. cholerae* bestätigt wurden. Diese Analysen wurden rein qualitativ durchgeführt. Da aber pro Probenahmezeitpunkt mehrere Proben von verschiedenen Standorten im See analysiert wurden (Abb. 4), konnte eine semiquantitative Aussage über den Prozentsatz der positiven Proben im Jahresverlauf getroffen werden. Mittels PCR konnte auch das Vorhandensein diverser Virulenzfaktoren analysiert werden. Zusätzlich zur Kultivierung wurde eine Methode der direkten spezifischen Detektion von *V. cholerae* mittels eines mikroskopischen Verfahrens entwickelt, das auf der Applikation von spezifischen rRNA Sonden beruht (FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) und quantitative Aussagen der Konzentration von *V. cholerae* in Laborproben als auch in Wasserproben ermöglichte (Abb. 5).

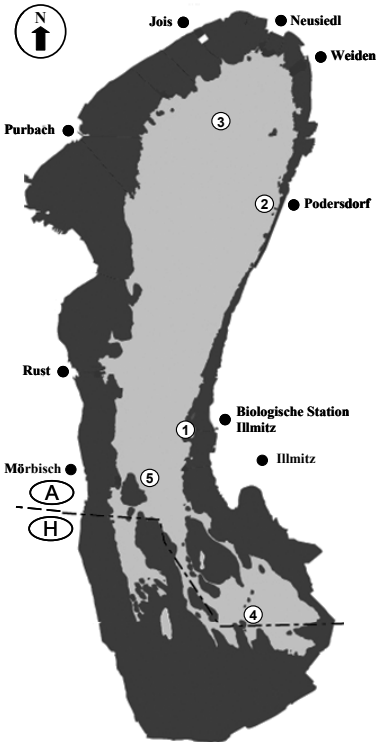

Abb. 4: Schematischer Überblick über den Neusiedler See mit den gewählten Probenahmepunkten (aus Kirschner et al. 2008). Die dunkelgraue Fläche zeigt den Schilfgürtel, die hellgraue Fläche den offenen See. – Fig. 4: Schematic map of Lake Neusiedlersee with the selected sampling sites (from Kirschner et al. 2008). The dark grey area shows the reed belt, the light gray area the open water.

Ergebnisse und Diskussion

Saisonaler Verlauf und Zusammenhang mit Umweltparametern – Im saisonalen Verlauf über mehrere Jahre zeigte sich zwischen dem Prozentsatz der positiven Proben und der Temperatur eine hoch signifikante Korrelation ($r = 0.65$, $p < 0.001$, $n = 100$; Abb. 6, Kirschner et al. 2008). Eine ebenfalls hoch signifikante Korrelation wurde mit dem Vorhandensein einer bestimmten im Freiwasser des Sees dominanten Zooplankton-Art festgestellt, nämlich mit der Cladocere *Diaphanosoma mongolianum* ($r = 0.62$, $p < 0.001$, $n = 94$; Kirschner et al. 2010), während mit den im See dominanten Copepoden *Arctodiaptomus spinosus* kein signifikanter Zusammenhang gefunden wurde.

Potenzielle Pathogenität der isolierten V. cholerae Stämme - Von den im Verlauf dieser Jahre von den verschiedenen Standorten des Sees isolierten

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

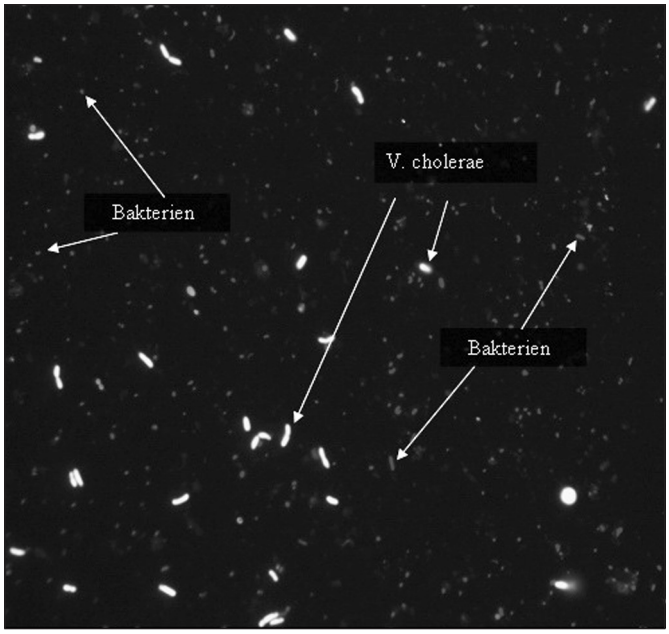

Abb. 5: Detektion von *V.cholerae* mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH): Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Wasserprobe (transformiertes Schwarz-Weiß Bild); hell leuchtende Zellen: *V. cholerae (im Farbbild grün; am vorliegenden schwarz-weiß-Bild sind nur zwei mit Pfeilen markiert)*; schwächer leuchtende Zellen: natürliche Bakterienflora (im Farbbild blau). – Fig. 5: Detection of *V. cholerae* using Fluorescence *in situ* Hybridisation (FISH): Epifluorescence Microscopy image of a water sample (black-white transformed image). bright cells: *V. cholerae (green in colour image; only two cells are marked by arrows in the presented black-white image)*; faint cells: natural bacterial flora (blue in colour image).

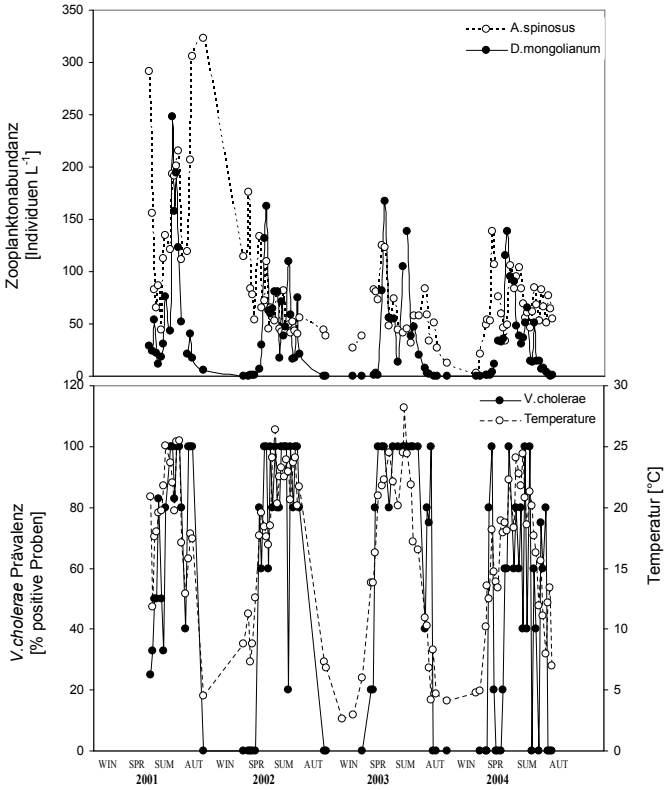

Abb. 6: Saisonaler Verlauf von *V. cholerae* (Prozentsatz positiver Proben), Temperatur und Zooplankton im Neusiedler See (aus KIRSCHNER et al. 2010). WIN: Winter, SPR: Frühling, SUM: Sommer, AUT: Herbst. – Fig. 6: Seasonal course of *V. cholerae* (percent positive samples), temperature and zooplankton in Lake Neusiedlersee (from KIRSCHNER et al. 2010). WIN: winter, SPR: spring, SUM: summer, AUT: autumn.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

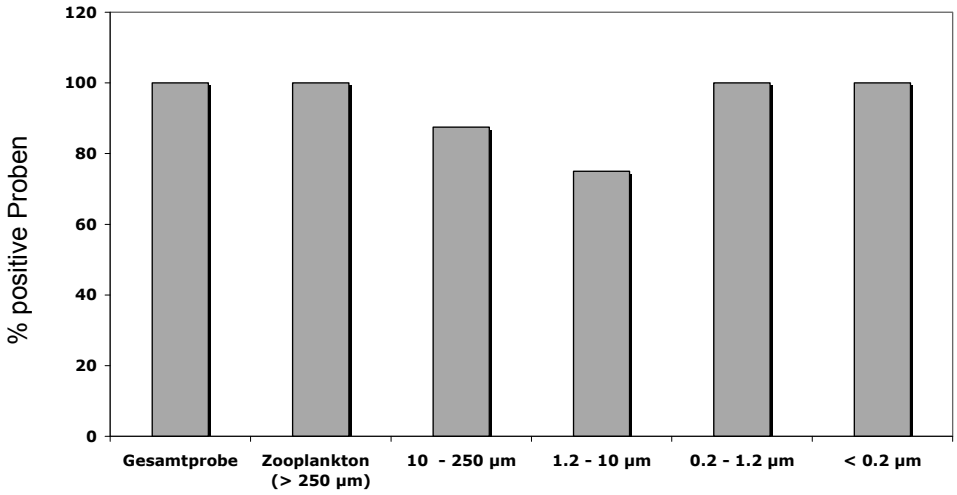

Abb. 7: Filtrationsexperimente (n = 8) zur Detektion von kultivierbaren *V. cholerae* in einzelnen Fraktionen des Wassers aus dem Neusiedler See (aus Kirschner & al. 2008). – Fig. 7: Filtration experiments (n = 8) to detect culturable *V. cholerae* in individual fractions of the water from Lake Neusiedlersee (from Kirschner et al. 2008).

Stämmen (> 400) wurde kein einziger Stamm als der Serogruppe O1 oder O139 zugehörig bestätigt, alle Stämme gehörten anderen Serogruppen an. Da die Serogruppenidentifizierung der nichtO1/nicht O139 Stämme aber extrem aufwändig ist, wurde diese nur bei einer Auswahl von wenigen Stämmen durchgeführt, wobei sich herausstellte, dass von 18 ausgewählten Stämmen 13 verschiedene Serogruppen gefunden wurden. Die Stämme stammten sowohl von Wasserproben als auch von Patienten. Eine Vielzahl an Stämmen dürfte im See vorkommen und eventuell auch verschiedene ökologische Nischen besetzen. Um es nochmals zu betonen, keiner dieser Stämme gehörte jedoch zu den Cholera-auslösenden Serogruppen O1 oder O139, und keiner der Stämme war im Besitz der für die Cholera notwendigen CTX oder TCP Gene. Andere Virulenzgene wie hlyA (Hämolysin), ompU (ein wichtiges Membranprotein) oder toxR (ein Toxinregulationsgen) wurden jedoch in 86–100% der Stämme festgestellt (Kirschner et al. 2008).

Planktisches Wachstum von V. cholerae – Auf der Suche nach der bevorzugten ökologischen Nische wurden Filtrationsexperimente durchgeführt, wobei Seewasser durch verschiedene Porengrößen filtriert und *V. cholerae* in den einzelnen Fraktionen mittels Kultivierung angezüchtet wurde (Abb. 7). Es zeigte sich, dass *V. cholerae* nicht häufiger auf Zooplankton als im Freiwasser detektiert werden konnte, sodass der Verdacht nahelag, dass – im Unterschied zu den meisten Ergebnissen aus der Fachliteratur – *V. cholerae* auch freilebend planktisch und nicht nur in Biofilmen auf Zooplankton erfolgreich wachsen dürfte. Da der Neusiedler See zu mehr als der Hälfte von einem dichten Schilfgürtel bedeckt wird, wurde die Hypothese entwickelt, dass *V. cholerae* aufgrund seiner Fähigkeit schwer abbaubare hochmolekulare Substanzen abbauen zu können (Chitinase, Mucinase), besonders durch die hohen Huminstoffkonzentrationen (= hochmolekulare Substanzen) aus dem Schilfgürtel gefördert würde. Dies wurde in Laborversuchen getestet. Es stellte sich aber heraus, dass – im Gegensatz zur formulierten Hypothese – die Huminstoffe einen signifikant negativen Einfluss auf die Wachstumsraten von *V. cholerae* hatten (Abb. 8), was auf eine Hemmung der Ektoenzyme des Bakteriums zu-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

rückgeführt wurde (KIRSCHNER et al. 2008). In diesen Versuchen zeigte sich aber auch, dass *V. cholerae* planktisch bei geeigneten Temperaturen (> 15 °C) ebenso rasch im Wasser wachsen konnte wie die autochthone Bakterienflora mit Wachstumsraten von 1.4 (15 °C)–6.8 (37 °C) pro Tag (KIRSCHNER et al. 2008). Hierbei ist anzumerken, dass diese Versuche mit Reinstämmen ohne Konkurrenz durch die natürliche Bakterienflora durchgeführt wurden.

Zooplankton und Konkurrenz durch die natürliche Bakteriengemeinschaft – Neben den Huminstoffen im See dürfte auch das Zooplankton einen signifikanten Einfluss auf die Vermehrung bzw. Abundanz von *V. cholerae* im See besitzen. Wie bereits aus der saisonalen Studie ersichtlich wurde, zeigte sich zwischen *V. cholerae* und *Diaphanosoma mongolianum* ein positiver Zusammenhang. Dies konnte in Co-Kultivierungsversuchen im Labor deutlich bestätigt werden. Bei Anwesenheit von *D. mongolianum* waren sowohl Wachstumsraten als auch Wachstumserträge signifikant höher als in den entsprechenden Kontrollen (Abb. 9a; $n = 6$, $p < 0.01$; KIRSCHNER et al. 2010). Im Gegensatz dazu hatte die Anwesenheit der Copepoden *Arctodiaptomus spinosus* einen negativen Einfluss auf Wachstumsraten und -erträge von. *V. cholerae* (Abb. 9b; $n = 6$, $p < 0.01$; KIRSCHNER et al. 2010). Dies war aber nicht auf direkten Fraß zurückzuführen (*A. spinosus* kann Partikel im bakteriellen Größenspektrum nicht aufnehmen), sondern auf die Inokulation von konkurrierenden Bakterien von den Oberflächen der Zooplankton-Organismen in den Versuchsansätzen. Die natürliche Bakterienflora stellt also zu einem großen Teil eine starke Konkurrenz für *V. cholerae* im Neusiedler See dar. Solches wurde auch schon für Stämme der Serogruppe O1 berichtet (LONG et al. 2005).

Betrachtet man die Anzahl der *V. cholerae* Zellen, die auf den Oberflächen der beiden Zooplankton-Arten gefunden wurde, zeigten sich auch hier hoch signifikante Unterschiede (Abb. 10). Auf einzelnen Individuen von *D. mongolianum* wurden im Durchschnitt 100 mal mehr *V. cholerae* Zellen detektiert als auf *A. spinosus*. Maximal beobachtete Zellzahlen waren $7{,}7 \times 10^5$ *V. cholerae* pro Individuum. Dass die Oberflächen der Cladoceren *D. mongolianum* einen positiven Einfluss auf *V. cholerae* besitzen, könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass das Wachstum von *V. cholerae* fördernde

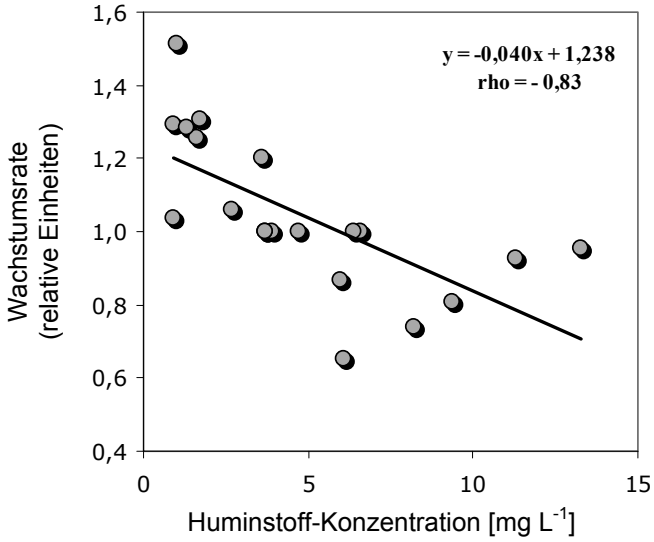

Abb. 8: Negativer Einfluss der Huminstoffe auf die Wachstumsraten von *V. cholerae* im Neusiedler See (aus KIRSCHNER et al. 2008). Regressionsgerade und Korrelationskoeffizient (Spearmans rho) sind angegeben. – Fig. 8: Negative impact of humic substances on the growth rates of *V. cholerae* in Lake Neusiedlersee (from KIRSCHNER et al. 2008). Regression line and correlation coefficient (Spearmans rho) are provided.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

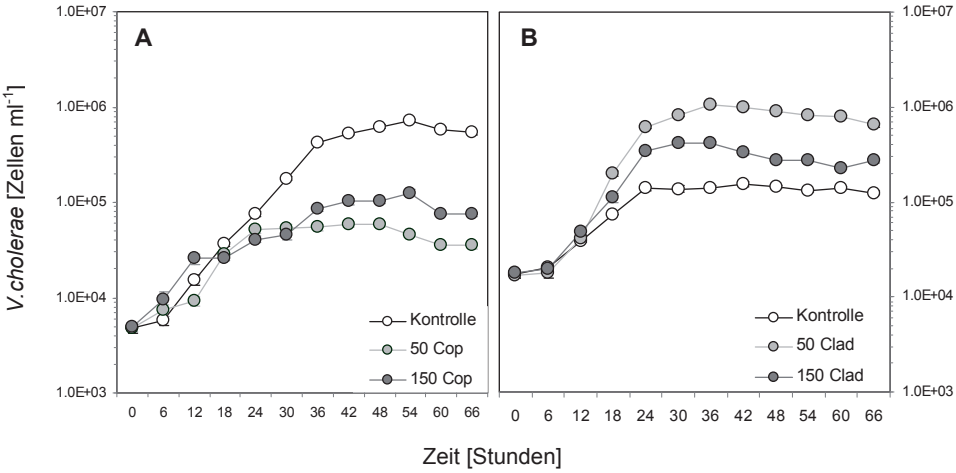

Abb. 9: Wachstumskurven von *V. cholerae* in Anwesenheit der dominierenden Zooplankton Organismen *A. spinosus* (Copepoden, A) und *D. mongolianum* (Cladoceren, B) im Vergleich zu Kontrollen ohne Zooplankton (aus Kirschner et al. 2010). – Fig.9: Growth curves of *V. cholerae* in the presence of the dominating zooplankton organisms *A. spinosus* (copepods, A) and *D. mongolianum* (cladocerans, B) compared with controls without zooplankton (from Kirschner et al. 2010).

Bakterien im Darm oder auf den äußeren Oberflächen der Zooplankter vorhanden sind. Diese Hypothese wird gerade in weiteren Versuchen getestet.

Invasionspotenzial Cholera pathogener Stämme – Obwohl bis jetzt kein einziger *V. cholerae* O1 oder O139 Stamm aus dem See isoliert werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass durch Einschleppung über den Menschen (erhöhte Reisetätigkeit, Tourismus) oder über Vögel (Halpern et al. 2008) in Zukunft Cholera pathogene O1 oder O139 Stämme in den See einwandern könnten. Um dies zu untersuchen wurden im Labor unter möglichst natürlichen Bedingungen (Anwesenheit von Konkurrenzbakterien, Anwesenheit von *D. mongolianum,* frisch während der Sommermonate genommenes Wasser aus dem

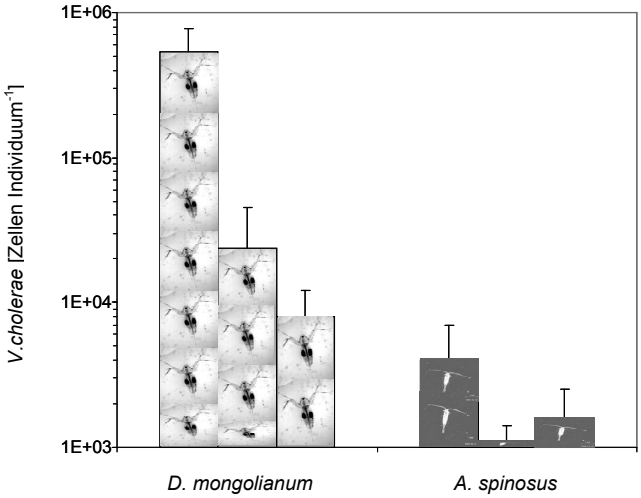

Abb. 10: Oberflächen assoziierte *V. cholerae* Zellen auf *D. mongolianum* und *A. spinosus* (n = 3 x 3). – Fig. 10: Surface-associated *V. cholerae* cells on *D. mongolianum* and *A. spinosus* (n = 3 x 3).

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

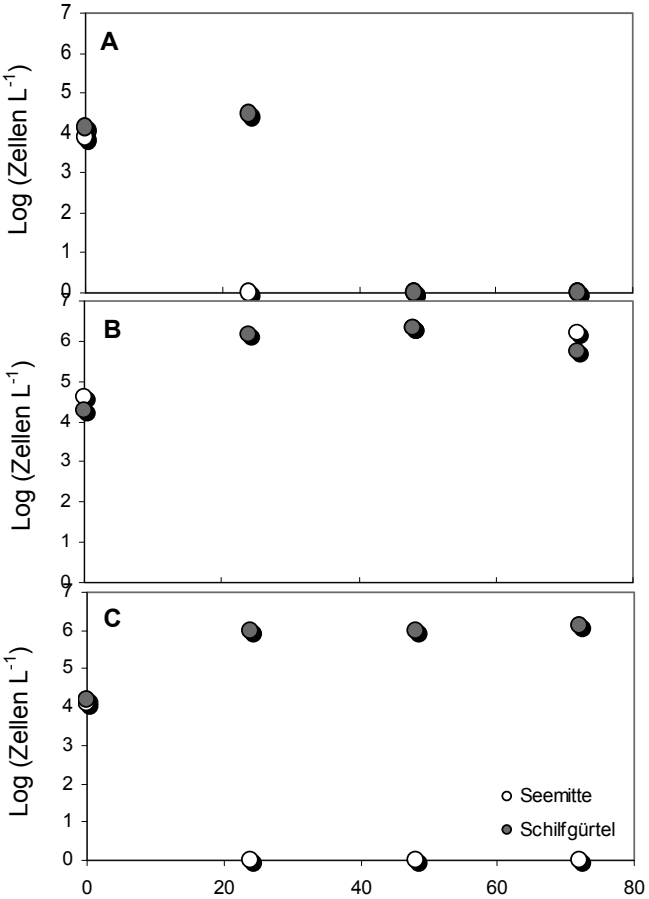

Abb. 11: Wachstumspotenzial verschiedener Cholera pathogener *V. cholerae* Stämme im Freiwasser (Seemitte) und Schilfgürtel des Neusiedler Sees, getestet in Laborversuchen. A: *V. cholerae* O1 El Tor, B: *V. cholerae* O1 classic, C: *V. cholerae* O139. – Fig. 12: Growth potential of various cholera pathogenic *V. cholerae* strains in the open water (center of lake) and reed belt of Lake Neusiedlersee, tested in laboratory experiments. A: *V. cholerae* O1 El Tor, B: *V. cholerae* O1 classic, C: *V. cholerae* O139.

See, hohe Temperaturen) getestet, ob sich hoch virulente *V. cholerae* O1 bzw. O139 Stämme in Wasserproben der Seemitte oder des Schilfgürtels vermehren können. Hierbei zeigten die unterschiedlichen Stämme ein unterschiedliches Wachstumspotenzial an den beiden Standorten (Abb. 11). Die Möglichkeit einer Invasion bestimmter Stämme unter bestimmten fördernden Bedingungen kann aufgrund der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Quantitative Daten als Grundlage für eine erste Risikoabschätzung – Im Jahr 2008 wurden erstmals quantitative Daten der Abundanz von *V. cholerae* im See erhoben. Hierfür wurde einerseits ein Protokoll verwendet, das auf der selektiven Kultivierung und anschließenden molekularbiologischen Bestimmung von *V. cholerae* beruht (BARON et al. 2007, STEINBERGER 2009), andererseits wurde auch die bereits erwähnte FISH Methode für Freilandproben adaptiert (STEINBERGER 2009). Von der Größenordnung her lieferten beide Methoden ziemlich gut übereinstimmende Ergebnisse. Mittels Kultivierung wurden im saisonalen Verlauf an zwei Standorten des Neusiedler Sees zwischen 0 und 48×10^3 KBE L^{-1} (KBE: Koloniebildende Einheiten) detektiert, mittels FISH wurden zwischen 3×10^3 und 28×10^3 Zellen L^{-1} detektiert (Abb. 12). Allerdings zeigte sich, wie zu erwarten war, dass mit der Kultivierungsmethode vor Mitte April aufgrund der niedrigen Temperaturen und wahrscheinlich ungünstigen Nährstoffverhältnisse keine positiven Er-

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

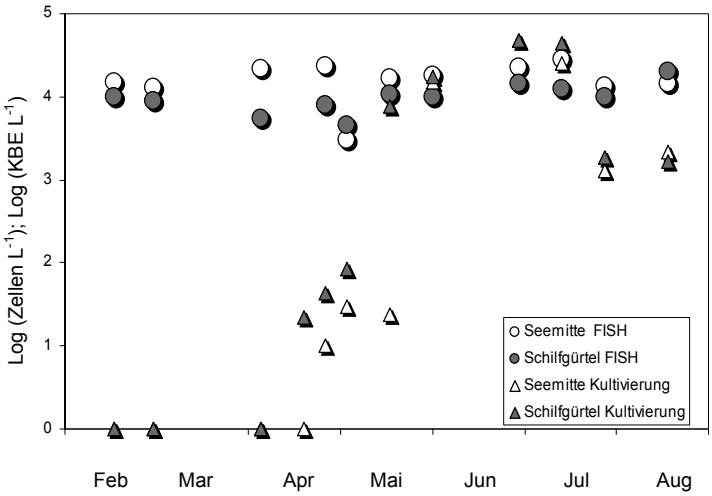

Abb. 12: Quantitative Detektion von *V. cholerae* mittels Kultivierung und FISH im Freiwasser und Schilfgürtel des Neusiedler Sees. – Fig. 11: Quantitative detection of *V. cholerae* based on cultivation and FISH in the open water and reed belt of Lake Neusiedlersee.

gebnisse erzielt werden konnten, obwohl *V. cholerae* Zellen in relativ konstanter Anzahl vorhanden waren. Wie aus der Literatur bekannt ist, können *V. cholerae* O1 Zellen, auch wenn sie sich im sogenannten VBNC Status befinden, dennoch ihre Infektivität behalten (CHAIYANAN & al. 2001). Ob dies auch für Vertreter anderer Serogruppen gültig ist, muss noch untersucht werden.

Schlussfolgerung und Risikoabschätzung

V. cholerae Bakterien im Neusiedler See besitzen gesundheitliche Relevanz, wobei abgesehen von einem Todesfall einer durch Chemotherapie immunsupprimierten Person fast ausschließlich Mittel- und Außenohrinfektionen gemeldet wurden. Es ist aber davon auszugehen, dass eine größere Dunkelziffer an Infektionen besteht, da aufgrund der relativen Seltenheit von *Vibrio cholerae* Infektionen in Österreich das Bewusstsein, dass Patienten an einer solchen erkranken können, bei Ärzten verständlicherweise nur in geringem Ausmaß ausgeprägt ist. Außerdem werden viele Patienten bei leichten Ohrenentzündungen bzw. Durchfällen nicht in jedem Fall einen Arzt aufsuchen.

Risikoabschätzung bezüglich Cholera – Der Tatsache, dass bis dato kein einziger *V. cholerae* O1 oder O139 Stamm aus dem See isoliert werden konnte, bzw. in keinem Isolat das Cholera-Toxin Gen oder das Gen für den Toxin-coregulierten Pilus nachgewiesen wurde, deutet auf eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit von Cholera auslösenden Stämmen im See hin. Die Möglichkeit, durch Verschlucken von Seewasser bei Freizeitaktivitäten an Cholera zu erkranken, ist demnach praktisch nicht gegeben. Allerdings ist in Zeiten der Klimaerwärmung (die durchschnittliche Wassertemperatur des Neusiedler Sees hat sich in den letzten 30 Jahren um 1.5 °C erhöht; persönliche Beobachtung) und erhöhten Mobilität von Reisenden die Möglichkeit durchaus vorhanden, dass Cholera auslösende Stämme unter günstigen Bedingungen in den See einwandern könnten, wie in Laborversuchen gezeigt werden konnte. Auch Vögel stellen im Vogelschutzgebiet Nationalpark Neusiedler See – Seewinkel eine immerwährende potenzielle Quelle der Einschleppung von *V. cholerae* O1 oder O139 Stämmen aus Epidemiegebieten in Afrika oder Asien dar. Dadurch könnte sich das Risiko in den nächsten Jahren auch erhöhen, was nach derzeitigem Wissensstand aber nicht abschätzbar ist.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Risikoabschätzung bezüglich gastrointestinaler Infektionen durch V. cholerae nicht O1/ nicht O139 – Für die folgende Risiko-Abschätzung musste die Annahme getroffen werden, dass die publizierten Infektionsdosis-Werte für gastrointestinale Infektionen für *V. cholerae* O1 und nicht-O1 Stämme identisch sind (bis dato wurden allerdings nur O1 Stämme diesbezüglich untersucht). Die im See gefundenen Konzentrationen im Freiwasser von bis zu 50×10^3 *V. cholerae* Zellen pro Liter sind im Vergleich zur berichteten Infektionsdosis bei gesunden Personen von 10^5–10^8 KBE (HORNICK et al.. 1971, SACK et al. 1998, SACK et al.. 2004) zu gering, um eine Darminfektion (wie Cholera) auszulösen. So müssten unter der obigen Annahme zwischen 2 und 2000 Liter Seewasser verschluckt werden. *V. cholerae* bildet aber auch Hot-Spots auf Zooplankton Organismen, wie in Laborversuchen gezeigt werden konnte, wo maximale Zelldichten von ca. 8×10^5 Zellen pro Individuum (!) (*D. mongolianum*) gefunden wurden. Bei einer Zooplankton-Dichte von 100 Individuen pro Liter, wie sie im See in der warmen Jahreszeit häufig anzutreffen ist, könnte das Verschlucken von wesentlich geringeren Mengen ausreichen, um eine Darminfektion zu verursachen. Es muss dabei aber berücksichtigt werden, dass beim Verschlucken von gleichmäßig im Wasser verteilten Zellen oder von auf Partikeln angehäuften Zellen Unterschiede in der Infektionswahrscheinlichkeit bestehen. Einerseits ist bei angehäuften Zellen die Kontaktrate mit dem Angriffsziel (Darmepithelzellen) wesentlich geringer, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung sinkt. Andererseits ist bei einer Anhäufung von *V. cholerae* im Inneren von Zooplankton-Individuen ein eventueller Schutz der Bakterien bei der Darmpassage gegeben, was zu einer Erhöhung des Risikos führt. Darüber sind jedoch keine Untersuchungen bekannt.

Risikoabschätzung bezüglich Ohren-, Wund- und Blutinfektionen durch V. cholerae nichtO1/nichtO139 – Wie hoch die Infektionsdosis bei Ohrenentzündungen, Wundentzündungen oder Blutvergiftung durch *V. cholerae* ist, wurde bis dato nicht untersucht. Die Infektionsdosis könnte aber deutlich unter den für Darminfektionen beschriebenen Werten liegen, da hier keine Passage der Bakterien durch den Magen stattfindet und Bakterien bei geschädigter Hautoberfläche bzw Schleimhäuten leichten Eintritt haben. Bei allen bisherigen beobachteten Fällen war eine Grunderkrankung vorhanden (Steliana HUHULESCU, persönliche Mitteilung), im Falle der letalen Sepsis war der Patient hochgradig immunsupprimiert. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass bei bereits gesundheitlich beeinträchtigten Personen wenige Zellen ausreichen können, um eine Ohren-, Wund- oder Blutinfektion auszulösen, während gesunde Personen nicht betroffen sein dürften.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass aus heutiger Sicht die Gefahr, an einer schwerwiegenden, von *Vibrio cholerae* ausgelösten Krankheit bei Freizeitaktivitäten im Neusiedler See zu erkranken, für gesunde Menschen als extrem gering eingestuft werden kann. Das Auftreten von Cholera insbesondere kann aus heutiger Sicht praktisch ausgeschlossen werden. Hochgradig immunsupprimierte Personen hingegen sollten bei offensichtlichem Vorhandensein von Wunden doch eine gewisse Vorsicht walten lassen und bei eventuell auftretenden Infektionen nach einem Freizeitaufenthalt am Neusiedler See dem behandelnden Arzt die Möglichkeit einer *Vibrio cholerae* Infektion erörtern.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

Dank

Die Studie wurde finanziert von der Arbeitsgemeinschaft Natürliche Ressourcen (AGN) aus Fördermitteln des Landes Burgenland. Besonderer Dank gilt dem gesamten Team der Biologischen Station Illmitz, ohne die, von der Probenahme angefangen bis zur Datenausarbeitung, die Studie nicht durchgeführt hätte werden können. Weiters ein herzliches Dankeschön an Frau Mag. Sonja Schauer, Frau Mag. Birgit Steinberger und Herrn Mag. Rupert Bliem für ihren Einsatz während ihrer Diplomarbeiten, die im Zuge der Studie durchgeführt wurden.

Literatur

Baron S., Chavalier S. & Lesne J., 2007: *Vibrio cholerae* in the environment: a simple method for reliable identification of the species. J Health Popul. Nutr. 25, 312–318.

Broza M. & Halpern M., 2001: Chironomid egg masses and *Vibrio cholerae*. Nature 412, 40.

Chaiyanan S., Chaiyanan S., Huq A., Maugel T. & Colwell R. R., 2001: Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. Syst. Appl. Microbiol. 24, 331–41.

Cheasty T., Said B. & Threlfall E. J., 1999: *Vibrio cholerae* non-O1: implications for man? The Lancet 354, 89–90.

Collwell R. R., Kaper J. B. & Joseph S. W., 1977: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other Vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science 198, 394–396.

Colwell R., Brayton P., Grimes D., Roszak D., Huq S. & Palmer L., 1985: Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related environmental pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. Bio/Technology 3, 817–820.

Halpern M, Senderovich Y. & Izhaki I., 2008: Waterfowl—The Missing Link in Epidemic and Pandemic Cholera Dissemination? PLoS Pathog 4, e1000173.

Hornick R. B., Music S. I., Wenzel R., Cash R., Libonati J. P., Snyder M. J. & Woodward T. E., 1971: The Broad Street Pump revisited: response of volunteers to ingested cholera vibrios. Bull N.Y. Acad Sci. 47, 1181–1191.

Huhulescu S., Indra A., Feierl G., Stoeger A., Ruppitsch W., Sarkar B. & Allerberger F., 2007: Occurence of *Vibrio cholerae* serogroups other than O1 and O139 in Austria. Wien. Klin. Wochenschr. 119/7–8, 235–241.

Huq A., Small E. B., West P.A., Huq M. I., Rahman R. & Colwell R. R. 1983: Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl. Environ. Microbiol. 45, 275–283.

Islam M. S., Mahmuda S., Morshed M. G., Bakht H. B. M., Khan M. N. H., Sack R. B. & Sack D. A., 2004: Role of cyanobacteria in the persistence of *V. cholerae* O139 in saline microcosms. Can J Microbiol 50, 127–131.

Islam M. S., Drasar B. S. & Sack R. B., 1994: The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: a review. J Diarrhoeal Dis Res 12, 87–96.

Kirschner A. K. T., Schlesinger J., Farnleitner A. H., Hornek R., Süss B., Golda B., Herzig A. & Reitner B., 2008: Rapid growth of planktonic *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains in a large alkaline lake in Austria: dependence on temperature and dissolved organic carbon quality. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2004–2015.

Kirschner A. K. T., Schauer S., Steinberger B., Wilhartitz I., Grim C., Huq A., Colwell R. R., Herzig A. & Sommer R., 2010: Interaction of *Vibrio cholerae* with *Arctodiaptomus spinosus* and *Diaphanosoma mongolianum* in dependence of competitive bacteria. Appl. Environ. Microbiol. (in revision)

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at

LONG R. A., ROWLEY D. C., ZAMORA E., LIU J., BARTLETT D. H. & AZAM F., 2005: Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol. 71, 8531–6.

MORRIS J. G., 1990: Non O1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. Epidemiol. Rev. 12, 179–191.

SACK D. A., TACKET C. O., COHEN M. B., SACK R.B., LOSONSKY G. A., SHINKO J., NATARO J. P., EDELMANN R., LEVINE M. M., GIANELLA R. A., SCHIFF G. & LANG D., 1998: Validation of a volunteer model of cholera with frozen bacteria as the challenge. Infection and Immunity 66, 1968–1972.

SACK D. A., SACK R. B., NAIR G. B. & SIDDIQUE A. K., 2004: Cholera. The Lancet 363, 223–232.

STEINBERGER B., 2009: Quantification of *Vibrio cholerae* in Lake Neusiedler See by means of classical and molecular biological methods. Diplomarbeit an der Abteilung für Wasserhygiene der Medizinischen Universtität Wien. 56 pp

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996–2008: Cholera. Weekly epidemiological records 71–83.

Anschrift:

Univ.-Ass. Mag. Dr. Alexander KIRSCHNER, Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Regina SOMMER, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie, Abteilung für Wasserhygiene, Medizinische Universität Wien, Kinderspitalgasse 15, 1095 Wien.
E-Mail: alexander.kirschner@meduniwien.ac.at, regina.sommer@meduniwien.ac.at.

Privatdoz. Mag. Dr. rer. nat. Andreas FARNLEITNER, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/166, 1060 Wien. E-Mail: a.farnleitner@aon.at.

Univ.-Prof. Direktor Dr. Alois HERZIG, Biologische Station Illmitz, 7142 Illmitz.
E-Mail: biol.stat@aon.at.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Schriften des Vereins zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse Wien

Jahr/Year: 2009

Band/Volume: 147

Autor(en)/Author(s): Herzig Alois, Kirschner Alexander, Sommer Regina, Farnleitner Andreas

Artikel/Article: Vibrio cholerae im Neusiedler See: Ein Grund zur Beunruhigung? 77-90