

Bakterium *Lawsonia intracellularis* erstmals beim Menschen nachgewiesen

Peter Rosler, Eduard Rosler, Gabriele Schneider

Lawsonia intracellularis (LI) ist ein gramnegatives Bakterium, das innerhalb der Klasse der Proteobacteria, Ordnung Desulfovibrionales, Familie Desulfovibrionaceae der monotypischen Gattung *Lawsonia* angehört. Das Bakterium ist pathogen für Schweine, aber auch bei zahlreichen Haus- und Wildtieren nachgewiesen (Hund, Pferd, Kalb, Hamster, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Rotwild und andere). Die serologische Prävalenz des Erregers wird in Europa, Nord- und Südamerika, Asien und Australien für Schweineherden zwischen 57 % und 100 %, für Deutschland mit 73 % bis 81 % angegeben [1]. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, der Frage nachzugehen, ob *Lawsonia intracellularis* beim Menschen nachweisbar ist.



Klassifizierung des Bakteriums

Lawsonia intracellularis weist einen engen Verwandtschaftsgrad zu *Desulfovibrio* ssp. und *Bilophila wadsworthia* aus. Die gebogenen, teilweise auch geraden stäbchenförmigen Bakterien sind ungefähr 0,25–0,5 x 1,25–1,75 µm groß, unbeweglich und wachsen streng intrazellulär. Der Erregernachweis wird aus Tier-Kot, Kottupfern und veränderter Darmschleimhaut mittels PCR, Immunfluoreszenz oder ELISA durchgeführt. Der serologische Nachweis von Antikörpern wird mittels eines Immunfluoreszenztests (IFT), Immunperoxidase Monolayer Assay (IPMA) oder Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Der serologische Nachweis von Antikörpern kann durch IFT, IPMA oder ELISA vorgenommen werden. An Darmproben (Ileum, Caecum, Colon) ist der Nachweis charakteristischer histomorphologischer Läsionen sowie der histochemische Nachweis von Erreger-spezifischem Antigen möglich, auch unspezifische Färbemethoden zur Darstellung des Erregers werden genutzt [2].

Lawsonia intracellularis verursacht beim Schwein eine proliferative Enteropathie mit pathomorphologisch unterschiedlichen Krankheitsbildern: im Vordergrund steht die porcine intestinale Adenomatose (PIA), die bei Absatzferkeln und jüngeren Mastschweinen chronisch-intermittierende Durchfälle und Kümern hervorrufen kann, sowie die proliferative hämorrhagische Enteropathie, die für akute hämorrhagische Diarrhoen und Todesfälle bei Schweinen in der Endmast und bei Jungsauen verantwortlich ist. Die nekrotisierende Enteritis und die regionale Ileitis gelten eher als Folgeerscheinungen der PIA. Am häufigsten verläuft die Infektion jedoch subklinisch [3]. Infolge der Veränderungen am Darm verwerten besonders Jungschweine das Futter schlechter und nehmen so nur langsam an Gewicht zu.

Der Verlauf der porcinen proliferativen Enteropathie zeigt Ähnlichkeiten zu Darmerkrankungen des Menschen wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Adenomatose, Zöliakie, Darmkrebs und dem Reizdarmsyndrom. Die Ätiologie dieser chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist nur teilweise bekannt und multifaktoriell. Als Krankheitsursachen werden neben genetischer Disposition und Störungen der Immunregulation der Darmschleimhaut auch bakterielle Infektionen angesehen, z.B. *Mycobacterium paratuberculosis* bei Morbus Crohn.

Übertragungswege

Trotz offensichtlich vielfältiger Übertragungsmöglichkeiten zwischen Schweinen bzw. anderen Tieren zum Menschen wurde *Lawsonia intracellularis* bisher nicht beim Menschen gefunden und gilt deshalb nicht als Zoonose-Erreger. In Colon-Biopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa konnte *Lawsonia intracellularis* mittels Immunhistochemie nicht gefunden werden [4]. Auch die Untersuchung humaner, intraoperativ entnommener Darmgewebeproben von 30 Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Divertikulitis, Darmverschluss, Pankreaskarzinom sowie Darm-gesunden Organspendern mittels PCR und jeweils 5 verschiedenen Primern erbrachte keinen Nachweis von *Lawsonia intracellularis* [5]. Bei der PCR-Untersuchung der Stuhlproben von 60 Kindern aus 5 europäischen Ländern, die auf Bauernhöfen mit Schweinehaltung aufwuchsen, wurde *Lawsonia intracellularis* nicht gefunden [6].

Nachweis von *Lawsonia intracellularis* beim Menschen

Für die Untersuchung wurden humane Stuhl- und Blutproben, die dem Labor Vitatest aus unterschiedlichen Indikationen eingesandt wurden, zusätzlich auf *Lawsonia intracellularis* geprüft. 2005 wurden 87 humane Stuhlproben von Patienten mit Vorbericht „chronische Darmbeschwerden“ aus dem Labor Vitatest in der Klinik für Kleine Klautiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover mittels IFT auf *Lawsonia* untersucht. Drei Proben aus einem infizierten Schweinebestand dienten als Kontrollen. Die im IFT verdächtigen Proben wurden mittels nested-PCR nachgetestet. Zusätzlich wurden 20 humane Serumproben von Patienten ohne den Vorbericht „Darmbeschwerden“, mittels eines für Schweine entwickelten indirekten IFT im genannten Institut auf Antikörper gegen *Lawsonia intracellularis* untersucht.

In den Jahren 2009 bis 2012 wurden weitere humane Stuhlproben, die in das Labor Vitatest eingesandt wurden, auf das Vorkommen von *Lawsonia intracellularis* untersucht. Die angewandten Verfahren wurden zur Untersuchung von Schweinekot- bzw. Schweineblut-Proben entwickelt und sind (bisher) nicht zur Untersuchung menschlicher Proben validiert.

Ergebnisse der Stuhl-Untersuchungen 2005

80 der 87 humanen Stuhlproben waren im IFT negativ. Bei 6 Proben fanden sich kokkoide stäbchenförmige Bakterien, jedoch nicht mit der für Lawsonien typischen Strukturform, eine Probe wies längliche, deutlich fluoreszierende Bakterien auf und eine der drei Proben vom Schwein war im IFT positiv (längliche stäbchenförmige Bakterien mit deutlicher Fluoreszenz). Alle im IFT verdächtigen Humanproben waren in der PCR negativ. In den humanen Stuhlproben gelang 2005 kein eindeutiger Nachweis von *Lawsonia intracellularis*.

Ergebnisse der Blut-Untersuchungen 2005

Von den 20 humanen Serumproben reagierten im indirekten IFT 8 Proben negativ, 7 fraglich und 5 positiv. Auch wenn der IFT-Serumtest für Schweine entwickelt wurde, wurde der Nachweis von Antikörpern gegen *Lawsonia intracellularis* von uns als hochgradig auffällig bezeichnet.

Ergebnisse der Stuhl-Untersuchungen 2009 bis 2010

Bei den Untersuchungen 2009 bis 2010 an 31 Stuhlproben wurden mittels nested-PCR im 2-, 3- bzw. 4-fach Ansatz bei 5 Proben jeweils 1-mal *Lawsonia*-DNA gefunden. 7 Proben, 6 humane (3 davon vorher in der PCR positiv) und eine *Lawsonia* positive Schweinekot-PCR-Probe wurden sequenziert. Die 3 PCR-positiven humanen und die 1 PCR-positive Schweinekotprobe konnten sequenziert werden, während im Gegensatz dazu die in der PCR negativen Proben aufgrund des fehlenden PCR-Produktes keine Sequenzen bzw. nur Primer-Sequenzen ergaben. Die sequenzierten Proben waren fast identisch zueinander.

Ergebnisse der Blut-Untersuchungen 2009 bis 2010

Von 7 Blutproben, die 2010 untersucht wurden, reagierte eine in den Verdünnungen 1:30 und 1:10 positiv. Es handelte sich um die Probe eines Patienten, bei dem keine PCR-Stuhl Diagnostik durchgeführt wurde.

Ergebnisse der Stuhl-Untersuchungen 2011 bis 2012

Von den 100 humanen Stuhlproben, die mittels nested-PCR mit Voranreicherung im zeitgleichen Doppelansatz untersucht wurden, reagierten 9 Proben jeweils 1-mal positiv. Diese 9 Proben wurden 2012 mit 3 PCR-Methoden im Doppelansatz nachuntersucht. Dabei reagierten alle 9 Proben in der nested-PCR und der real-time PCR negativ, während in der nested-PCR mit Voranreicherung 4 Proben 2-mal positiv, 3 Proben 1-mal positiv und 2 Proben 2-mal negativ reagierten. 20 Proben, darunter die 9 vorher in der PCR einfach positiven Proben, wurden sequenziert. Alle in der PCR negativen Proben wurden als negativ bestätigt. Die positiven Proben wurden, bis auf eine Ausnahme, als positiv bestätigt. Die Sequenzen unterscheiden sich vermutlich lediglich durch die Anzahl der A-Reste nach der Position 85. Ab Position 93 ist dadurch meist ein leichter (n-1)-Anteil zu erkennen, weil das an dieser Position angegebene A in unterschiedlicher Stöchiometrie nur in einem Teil der vorliegenden DNA enthalten war. Meist fehlte das A nur in etwa 10–30 % der DNA, bei einer Probe dominierte allerdings die um ein A verkürzte Variante und bei einer weiteren Probe fehlte diese Base sogar vollständig. Sie wichen somit erkennbar von der Positivkontrolle (LI vom Schwein) ab.

Ergebnisse der Blut-Untersuchungen 2011

Von 50 Blutproben, die 2011 serologisch auf *Lawsonia*-Antikörper untersucht wurden, reagierten 23 Proben negativ (46 %),

19 fraglich (38 %) und 8 (16 %) positiv. Von den 9 Patienten, die in der PCR einen positiven *Lawsonia*-Nachweis erbrachten, schickten 8 auch eine Blutprobe. Diese war 3-mal positiv (38 %), 4-mal fraglich (50 %) und 1-mal negativ (12 %). Bei 42 Einsendern PCR-negativer Stuhlproben reagierten die serologischen Proben 5-mal positiv (12 %), 15-mal fraglich (36 %) und 22-mal negativ (52 %).

Andere Parameter bei untersuchten Stuhlproben 2009 bis 2011

Parallel zur Untersuchung auf LI wurden in den Stuhlproben verschiedene Parameter, entsprechend den individuellen Anforderungen, bestimmt: Gallensäuren, Pankreas-Elastase, sekretorisches Immunglobulin A gesamt, sekretorisches Immunglobulin A 1, sekretorisches Immunglobulin A 2, Defensin, Histamin, Serotonin, Calprotectin, Dopamin, M2-Pyruvat-Kinase (M2PK), Anti-Gliadin-IgA, Hämoglobin/Haptoglobin/okkultes Blut, C-reaktives Protein sensitiv (CRPs), enterales IgE, enterales IgG und enteropathogene Parasiten. Es wird unterschieden zwischen LI-positiven (+) und LI-negativen (-) Proben.

Diskussion der Ergebnisse

Bereits unsere Untersuchungen aus dem Jahr 2005 deuteten an, dass *Lawsonia intracellularis* auch beim Menschen vorkommen kann. Während ein Nachweis des Erregers in 87 Stuhlproben damals nicht gelang, ließen die Ergebnisse der serologischen Tests vermuten, dass Lawsonien beim Menschen eine immunologische Reaktion bewirken können. Diese Ergebnisse waren unserer Kenntnis nach international der erste Hinweis von Immunreaktionen des Menschen auf *Lawsonia intracellularis* [9].

2009 bis 2012 wurden insgesamt 131 humane Stuhlproben mittels PCR untersucht. Davon ließ sich in 14 Proben mittels nested-PCR mit Voranreicherung *Lawsonia*-DNA nachweisen. Die Sequenzierung von 26 Proben, 12 PCR-positiv und 14 PCR-negativ, ergab 11-mal *Lawsonia intracellularis*-Sequenzen bei in der PCR-positiven Proben. Anzumerken ist, dass (n-1)-Sequenzanteile typischerweise nach homopolymeren Sequenzabschnitten auftreten können, insbesondere bei PCR-Produkten, wo dieses Polymeraseartefakt bereits während der Amplifizierung entsteht und in der Sequenzierung verstärkt wird. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen deutet jedoch das sehr kurze poly(A)-Segment sowie die variable Stöchiometrie in den ansonsten identischen Sequenzen auf eine tatsächliche Variabilität in der Anzahl der A-Reste hin.

Betrachtet man vergleichend die Ergebnisse von PCR, Sequenzierung und Serologie, so fällt auf, dass PCR und Sequenzierung, mit Ausnahme einer Probe, übereinstimmen. Ein Zusammenhang zwischen serologischem Antikörpernachweis und PCR bzw. Sequenzierung ist erkennbar. Bei positiver PCR bzw. Sequenzierung ist die Serologie deutlich häufiger positiv bzw. fraglich als bei negativer PCR.

Die erneute Untersuchung von 9 Stuhlproben nach etwa 3 Monaten erbrachte keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Erstuntersuchung. Auch die Ergebnisse der serologischen Untersuchung von 7 Blutproben konnten nicht in Bezug zu Vorergebnissen gesetzt werden. Die Nachuntersuchung von 9 Stuhlproben in 2012 ergab

mit der nested-PCR mit Voranreicherung bei 7 von 9 Proben erneut positive Ergebnisse (z. T sogar in Doppelbestimmung). Andere PCR-Methoden dagegen zeigten negative Ergebnisse.

Lawsonien werden diskontinuierlich ausgeschieden. Vom Schwein ist bekannt, dass Kotuntersuchungen in erster Linie Aussagen zur Prävalenz des Erregers im Bestand gestatten, während die Einzeltierdiagnostik mehrfache Kotuntersuchungen, serologische Diagnostik bzw. histologische Untersuchungen von Darmmaterial erfordert. Insbesondere in akuten Erkrankungsphasen, mit großen Mengen ausgeschiedener Erreger, gelingt der Lawsonien-Nachweis häufiger [10].

Jede der verwendeten Nachweismethoden von LI ist den anderen gegenüber mit bestimmten Vor- bzw. Nachteilen behaftet. Der PCR wird eine höhere Sensitivität als dem IFT zugeschrieben [11]. Kotproben enthalten Bestandteile, die eine PCR inhibieren können [12], und Stuhlbestandteile können, insbesondere bei längerer unsachgemäßer Lagerung, DNA zersetzen. Dies erklärt beispielsweise, warum Nachweishäufigkeiten und Trefferquoten einzelner Verfahren variieren, während PCR und Sequenzierung übereinstimmen. Als Nachweisgrenze für LI mittels PCR werden 103 Kopien/ml angegeben [13]. Die Sensitivität der nested-PCR für LI wird als hundertfach höher beschrieben [7]. Dies könnte erklären, warum 2005, unter Verwendung von IFT bzw. PCR, ein Erregernachweis von LI beim Menschen nicht gelang. Die unterschiedlichen Resultate der nested-PCR, nested-PCR mit Voranreicherung und real-time PCR bei den Nachuntersuchungen von 2012 sollten im Rahmen zukünftiger Untersuchungen geklärt werden.

Die Ergebnisse der nested-PCR mit Voranreicherung und insbesondere der Sequenzierung sprechen dafür, dass LI beim Menschen vorkommt. Sowohl 2005 als auch 2009–2011 konnte gezeigt werden, dass LI beim Menschen immunologische Reaktionen auslöst. Obwohl die hier beschriebenen Untersuchungen viele Fragen aufwerfen, zeigen sie, dass – entgegen aller bisherigen Erkenntnisse – Lawsonia intracellularis beim Menschen vorkommt.

Ableitbare Konsequenzen

Für das weitere Verständnis von Lawsonien-Infektionen und zur Klärung der Frage ob und welche Bedeutung die Infektion mit diesem Erreger beim Menschen hat, sind weitere Untersuchungen nötig.

Die Ergebnisse der Analyse anderer Parameter bei den untersuchten Stuhlproben (2009 bis 2011) deuten an, dass verminderte Aktivität des exokrinen Pankreas und/oder verminderte Bildung von Defensin Folge oder Ursache einer LI-Infektion sein könnten oder dass sich Hämorrhagien bei LI-Infektionen häufen könnten. Es sollte außerdem geklärt werden, ob LI beim Menschen Erkrankungen hervorruft und wenn ja, wie und wann die Infektion erfolgt und welchen klinischen Verlauf die Erkrankung nimmt.

Ob Infektionen mit LI mit den so genannten „chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen“ des Menschen in Verbindung stehen, bleibt zu untersuchen. Wenn LI beim Menschen Erkrankungen hervorruft, wäre die Entwicklung spezifischer Diagnose- und Therapieverfahren für die Humanmedizin ein weiterer notwendiger Schritt.

Zusammenfassung

Weltweit wird Lawsonia intracellularis bei Hausschweinen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde der Erreger bei zahlreichen weiteren Haus- und Wildtieren gefunden. Pathogenität ist für Schwein und Pferd nachgewiesen. Trotz offensichtlich vielfältiger Übertragungsmöglichkeiten konnte Lawsonia intracellularis bisher beim Menschen nicht gefunden werden. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, der Frage nachzugehen, ob Lawsonia intracellularis den Menschen infiziert.

Bereits 2005 konnten wir nachweisen, dass beim Menschen Serum-Antikörper gegen LI vorkommen, während der Erregernachweis damals nicht gelang. Wegen der nun höheren diagnostischen Sensitivität wurden in den Jahren 2009 bis 2012 insgesamt 131 humane Stuhlproben zusätzlich mittels PCR auf Lawsonia intracellularis untersucht. 14 dieser Proben waren jeweils einmal in der nested-PCR mit Voranreicherung positiv. Aus dem PCR-Produkt von 13 dieser 14 Proben wurde eindeutig Lawsonia intracellularis sequenziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass LI beim Menschen immunologische Reaktionen auslöst und zwar bei Patienten mit LI-Nachweis deutlich häufiger. Obwohl die Untersuchungen zahlreiche Fragen aufwerfen, zeigen sie, entgegen aller bisherigen Erkenntnisse, dass Lawsonia intracellularis beim Menschen vorkommt.

Korrespondenzadresse:
 Dr. Gabriele Schneider
 Vitatest Drs. Rosler GbR
 Am Weissen Haus 10, 97772 Wildflecken
 E-Mail: schneider@vitatest.de

Das ausführliche Untersuchungsprotokoll kann bei der Autorin kostenfrei angefordert werden.

Literatur (Auswahl)

- [1] Mc Orist et al. 2003, Wendt et al. 2006, Holyoake et al. 2010
- [2] Guedes et al. 2002, Huerta et al. 2003
- [3] Pohlenz 2005
- [4] Pitcher et al. 1995
- [5] Michalski et al. (2006): Human inflammatory bowel disease does not associate with Lawsonia intracellularis infection. BMC Microbiology, 6:81
- [6] Jacobson et al. (2007): Survey on the occurrence of Brachyspira species and Lawsonia intracellularis in children living on pig farms. Epidemiol.Infect. 135, 1043-1045
- [7] Jones et al. (1993): Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31, 2611-2615
- [8] Nathues, Holthaus (2009): Quantification of Lawsonia intracellularis in porcine faeces by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology, 107, 2009-2016
- [9] Schneider et al. (2005): Vom Schwein zum Menschen – eine neue Zoonose durch Lawsonia intracellularis? Naturheilpraxis 07/2005, 1005
- [10] Nathues H (2007): Untersuchungen zur Ausscheidung von Lawsonia intracellularis mittels molekularbiologischer Untersuchungsverfahren. Außenstelle für Epidemiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- [11] Bonitz A (2011): Untersuchungen zur Diagnostik und Prävalenz von Infektionen durch Lawsonia intracellularis bei Schweinen unterschiedlicher Altersgruppen. Klinik für kleine Klautiere und forensische Medizin und Ambulatorische Klinik, Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- [12] Deuter et al. (1995): A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR. Nucleic Acids Res. 23, 3800-3801; Jacobson et al. (2004): Routine diagnostics of Lawsonia intracellularis performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. Vet. Microbiol. 102, 189-201
- [13] La et al. (2006): Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae, and Brachyspira pilosicoli in porcine faeces. Lett. Appl. Microbiol. 42, 284-288

Weitere Literatur beim Verfasser