

Die Bedeutung endotoxinbildender Bakterien für die Praxis

Dietrich Schimmel

Institut für Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes (Robert von Ostertag-Institut) – Bereich D-Jena

Zusammenfassung

Lipopolysaccharide (Endotoxine) verursachen nach Resorption aus dem Magen-Darm-Kanal, nach aerogener Aufnahme und bei Septikämien dosisabhängig klinische Reaktionen, die von prodromalen Symptomen des Schocks bis zum akuten Schock mit exitus letalis reichen. Die experimentelle Verabreichung von Lipopolysacchariden an Kälber führte zu pneumonischen Veränderungen ohne bakterielle experimentelle Infektion.

Summary: The importance of endotoxin producing bacterias for practical purposes.

Lipopolysaccharides (endotoxin) cause according to resorption out of the intestinal tract or aerogenic inhalation or by a septic infection clinical signs. The clinical reactions are praeshock symptoms, acute forms of shock and death. The experimental intratracheally administration of lipopolysaccharides into calves caused pneumonic lesions without bacterial experimental infection.

Keywords: Lipopolysaccharides, endotoxin effects in animals

Einleitung

Als Endotoxine wurden vor ihrer chemischen Charakterisierung Substanzen mit toxischer Wirkung bezeichnet, die im Inneren von Bakterien gebildet und im Gegensatz zu den Exotoxinen nicht in das umgebende Milieu abgegeben werden. Nur nach Zerfall der Bakterienzelle werden sie freigesetzt und können ihre toxische Wirksamkeit entfalten. Heute sind diese Substanzen als Lipopolysaccharide charakterisiert und stellen einen essentiellen Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien dar. Sie bestehen aus Polysacchariden und einem Lipid A. Sie kommen weitverbreitet vor und haben Bedeutung bei allen Infektionen mit gramnegativen Bakterien, z.B. *E. coli*, Salmonellen, *Proteus*, *Pseudomonaden*, *Actinobacillus pleuropneumo-*

niae, Pasteurellen, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* u.a. Die pathogenetische Bedeutung von Endotoxinen ist für verschiedene Krankheitsbilder unserer Haustiere erkannt und beschrieben worden.

Zur biologischen Wirksamkeit von Endotoxinen gramnegativer Bakterien ist in den letzten Jahren vor allem im Zusammenhang mit der Pathogenese von Infektionskrankheiten wiederholt berichtet worden (Tabelle 1).

Die während des Krankheitsverlaufes gebildeten Endotoxine verursachen ausgeprägte Veränderungen der Mikrozirkulation, in deren Folge sowohl klinische als auch pathologisch-anatomische Schocksymptome auftreten können (Tabelle 2). Dabei wird der Schock im Sinne einer Definition von Neuhof und Lasch (1970) als „eine akute, mehr oder weniger generalisierte unzureichen-

Tabelle 1: LPS- bzw. Lipid-A. Wirkungen nach Galanos und Freudenberg (1993)

-
- Letalität
 - Pyrogenität
 - lokale Schwartzmann Reaktion
 - Endotoxintoleranz
 - Adjuvanswirkung
 - Aktivierung von Komplement
 - Aktivierung von Gerinnungsfaktoren
 - Aktivierung von Makrophagen
 - Aktivierung von Granulozyten
 - Induktion von Tumor-Nekrose-Faktor
 - Induktion von Interleukin 1
 - Induktion von Interferon
 - Induktion von Prostaglandinen
 - mitogen für B-Lymphozyten
 - Induktion unspezifischer Resistenz
 - Strahlenschutz
-

de Durchblutung der Kreislaufperipherie mit den Folgen der Gewebshypoxie und metabolischen Azidose“ verstanden. Er verläuft zum einen klinisch sehr heftig und oft tödlich, zum anderen sind auch subklinisch verlaufende Reaktionen von Bedeutung. Im Vordergrund stehen die Veränderungen der Blutzirkulation. Sie stellen als ausgebreitete intravasale Gerinnungsvorgänge die Ursache für irreversible Organschädigungen dar.

Lipopolysaccharide gelangen im wesentlichen auf drei Wegen in die Zirkulation:

1. nach Resorption durch die Schleimhaut des Magen-Darm-Kanals
2. bei septikämischen Infektionen mit gramnegativen Bakterien
3. nach Inhalation größerer Mengen gramnegativer Bakterien.

ad 1. Im Magen-Darm-Kanal werden durch die angesiedelte Bakteri-

enflora ständig Lipopolysaccharide gebildet und durch Bakteriolyse auch im Magen-Darm-Inhalt freigesetzt, ohne daß Resorptionen ablaufen, die zu endotoxisch bedingten Reaktionen führen. Auch die orale Aufnahme größerer Endotoxinmengen werden z.B. von Schwein und Kalb ohne klinische Reaktionen toleriert. Erst drastische Schleimhautschädigungen oder klinische Schockzustände steigern die Endotoxinresorption (Koch et al., 1993). Nach Resorption über die Magen-Darm-Schleimhaut gelangen die Lipopolysaccharide über die Pfortader in die Leber und werden in diesem Organ durch die Kupferschen Sternzellen gebunden und abgebaut. Erst wenn die Clearance Funktion der Leber erschöpft ist – durch zu große Endotoxinanflutung bzw. durch Leberschädigung bedingt –, gelangt Endotoxin in den allgemeinen Kreislauf.

ad 2. Bei septikämisch verlaufenden Infektionen mit gramnegativen Bakterien befindet sich Endotoxin durch Lysis von Bakterien bereits im Kreislauf.

ad 3. Nach aerogener Aufnahme von Lipopolysacchariden werden diese durch die Alveolarmakrophagen gebunden. Dabei laufen Reaktionen ab, die zu klinisch manifesten Symptomen führen können. Ist die Eliminierungskapazität dieser Zellen erschöpft, gelangen die Endotoxine in die Zirkulation. Als Rezeptor für das Lipopolysaccharid ist der CD14-Marker von mononukleären Zellen erkannt worden (Porro, 1994). Nach der Bindung laufen kaskadenartige Reaktionen ab, als deren Folge die Freisetzung von Entzündungsfaktoren genannt werden kann. Diese Faktoren tragen die Verantwortung für weitere klinische Symptome (Tabelle 2).

Frühere Ergebnisse

Die experimentelle parenterale Verabreichung von Endotoxin führt beim Kalb je nach Dosis innerhalb weniger Minuten bereits zu klinisch sichtbaren Symptomen wie: Atembe-

Tabelle 2: LPS-bedingte klinische Symptome

- erhöhte Atemfrequenz, Speicheln, Erbrechen, Durchfall
- vermindertes Herzminutenvolumen
- Hypotension (Spätsymptom)
- Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes durch Vasokonstriktion
- Dilatation der Kapillaren
- anaerobe Gewebsstoffwechselveränderung
- Mangel durchblutung in Gehirn, Herz, Leber, Darm, Niere (Oligurie-Anurie, Urämie)
- gesteigerte Blutgerinnung (disseminierte intravasale Gerinnung)
- erhöhte Kapillarpermeabilität (Lungenödem)
- Hyperlipidämie

schleunigung, Pulsfrequenzsteigerung, Nasenausfluß sowie Speichelfluß und im weiteren Verlauf zur ausgeprägten Dyspnoe.

Die eigenen experimentellen Arbeiten liegen längere Zeit zurück (Schimmel, 1987). Wir verabreichten in einer ersten Versuchsreihe wiederholt Endotoxinpräparationen (abzentrifugierter Ultraschall-extrakt einer Pasteurellensuspension von 3×10^{10} Bakterien/ml) intravenös (0,1 ml) und oral (1000–3000 ml). Die Lungenveränderungen beurteilten wir 5 Tage nach der letzten Toxinapplikation, ohne daß die Tiere einer Belastungsinfektion unterzogen wurden. Die Ausprägungsgrade der pneumonischen Veränderung wurden addiert und als Durchschnitt für die Versuchsgruppe angegeben. Bakteriologisch wurden Lungen und Lungenlymphknoten untersucht.

Die Tiere, denen nur intravenös Endotoxinpräparationen verabreicht wurden, wiesen akute pneumonische Veränderungen auf. Bei allen Tieren konnte aus den Lungen *P. multocida* isoliert werden, obwohl keine experimentelle Infektion mit Pasteurellen ausgeführt worden war.

Nach wiederholter oraler Applikation von Antigenmengen über 2,5 l wurden bei keinem Tier pneumonische Veränderungen festgestellt.

In einer zweiten Versuchsreihe verabreichten wir an Kälber *P. multocida* Stämme Serotyp A nach Carter intratracheal und belasteten die Tiere nach der Infektion zusätzlich intravenös mit Endotoxinpräparationen. Die intratracheale Infektion und nachfolgende Toxinbelastung führte bei allen Tieren zu akuten

pneumonischen Veränderungen. Alleinige intratracheale Infektionen hingegen verursachten nur geringfügige Lungenveränderungen.

Die Untersuchungen von Parametern der Blutgerinnung ergaben keine Veränderungen der plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Die Werte für Heparintoleranztest, Rekalkifizationszeit, partielle Thromboplastinzeit, Quickwert und Thrombinzeit bewegten sich vor und nach der Endotoxinapplikation im gleichen Bereich. Die Thrombozytenzahlen verminderten sich, die Aggregationsstufen stiegen an, und die Adhäsion der Blutplättchen nahm zu.

Die *in vitro* Untersuchungen zum Einfluß von verschiedenen Antigenpräparationen von *P. multocida* auf humane Thrombozyten ergaben keine Auswirkungen auf die Aggregation.

Diskussion

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß durch die Verabreichung von Endotoxin in Dosen, die nur geringfügig klinische Schocksymptome verursachen, Reaktionen an der Lunge ausgelöst werden, die zu einer akuten Lungenentzündung führen. Da eine bakterielle Besiedlung des Respirationstraktes ständig gegeben ist, treten Lungenveränderungen mit positivem bakteriologischem Befund auch ohne zusätzliche intratracheale Infektion auf. Aus diesem Grund sind auch die pneumonischen Veränderungen nach der Kombination Toxin mit anschließender Infektion oder zeitlich umgekehrt nicht ausgeprägt.

Wie Berichten der Literatur zu entnehmen ist, wird eine klinisch manifeste Pneumonie durch verschiedene Noxen hervorgerufen, u.a. auch durch den Schock. Die an der Lunge ablaufenden schockbedingten Reaktionen begünstigen eine Infektion der Lunge.

Die Ergebnisse der eigenen Experimente zeigen, daß die intravenöse Endotoxinverabreichung ohne experimentelle Infektion mit *P. multocida* eine akute katarrhalische Pneumonie hervorrufen kann, die jedoch in Verbindung mit einer Pasteurelleninfektion steht. Derartige Veränderungen könnten auch durch parenteral verabreichte endotoxinhaltige Arzneimittel ausgelöst werden.

Pasteurellen werden sehr oft im Nasensekret gesunder Kälber nachgewiesen. Sie besiedeln die Nasenhöhle und den Kehlkopf; in Trachea und Bronchien werden sie nur selten angetroffen. Das Keimreservoir für die unteren Atemwege ist demnach im nasopharyngealen Raum zu suchen. Die Mikroorganismen werden offenbar durch den mukoziliaren Strom bzw. durch lokale Abwehrmechanismen am weiteren Vordringen gehindert. Die Reaktionen auf parenterale Endotoxinverabreichungen stören diesen Zustand und schaffen die Möglichkeit für eine Besiedlung der Bronchien und der Lungen. Die eigentlichen Reaktionen für das Haften und Angehen von Infektionen sind noch nicht bekannt. Es werden Störungen der Ausscheidfunktion, des Mukoziliarestromes, der Surfactantfunktion und der Immunantwortreaktion genannt.

Die Angaben des Schrifttums sowie die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, daß Lipopolysaccharide in Abhängigkeit von der Dosis zu unterschiedlichen Schädigungen des tierischen Organismus führen können. Reaktionen auf Endotoxine begünstigen auch den Übergang latenter Infektionen bzw. auch harmloser bakterieller Besiedlungen in klinisch manifeste Reaktionen. Zur Infektionsprophylaxe sollten Tiere auch vor Endotoxinen, soweit dies möglich ist, durch nach-

folgend aufgeführte Möglichkeiten geschützt werden:

- Reduktion des Keimgehaltes in der Stallluft
- Immunprophylaxe gegen wichtige Infektionen mit gramnegativen Bakterien
- Prüfung aller parenteral verabreichter Präparate auf Endotoxingehalt (die Prüfungen sind ohne Tierversuche mit *in vitro* Verfahren möglich)
- frühzeitige antibiotische Therapie bei Infektionen durch gramnegative Bakterien mit Präparaten, die wenig Endotoxin aus den zu beeinflussenden Bakterien freisetzen
- klinische Symptome des Endotoxinschocks, auch prodromale Anzeichen sollten rechtzeitig behandelt werden.

Neben dem bekannten therapeutischen Vorgehen werden in jüngster Zeit auch weitere Möglichkeiten diskutiert.

Die Anwendung von Antibiotika bei septischen Erkrankungen birgt auch die Gefahr der erhöhten Freisetzung von LPS in sich. *In vitro* wurden durch die Antibiotika Cefotaxim, Ciprofloxacin und Piperacillin höhere LPS-Mengen aus gramnegativen Bakterien freigesetzt als durch Tobramycin (Crosby et al., 1994). Diese Unterschiede stehen mit einer verschiedenartigen Wirkung der Präparate auf die Zellwand im Zusammenhang. Weitere Einflußmöglichkeiten auf LPS-Wirkungen ergeben sich in der Zukunft möglicherweise auch durch die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen das Lipid A. Durch Experimente (Fang et al., 1993) mit einem solchen Antilipid-A-Antikörper konnte die LPS-Wirkung verschiedener gramnegativer Bakterien auf die Bildung des Tumor-Nekrose-Faktors und des Interleukin-1 β aus humanen Blutmonozyten unterdrückt werden. Eine Präinkubation von LPS mit dem Anti-Lipid-A-Antikörper führte bei Ratten zu erhöhten Überlebensraten im Vergleich zu nicht vorbehandeltem LPS. Auch mit Antikörpern gegen das CD14-Merkmal von Monozyten und Makrophagen konnten

bei gleichzeitiger Abwesenheit von Humanserum LPS-Wirkungen blockiert werden (Arditti et al., 1993). Diese Effekte bezogen sich insbesondere auf LPS-bedingte Endothelschädigungen.

Literatur

- Arditti, M., Zhou, J., Dorio, R., Wei Rong, G., Goyert, S. M. und Sik Kim, K. (1993). Endotoxin-mediated Endothelial cell injury and activation: role for Soluble CD14. *Infect.Immun.* 61, 3149–3156.
- Crosby, H. A., Bion, J. F., Penn, C. W. und Elliott, T. S. J. (1994). Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J.Med.Microbiol.* 40, 23–30.
- Fang, I. S., Wisniewski, M. A., Huntenburg, C. C., Knight, L. S., Bubbers, J. E. und Schneidkraut, M. J. (1993). Inhibition of Lipopolysaccharide-associated Endotoxin activities in vitro and in vivo by the human anti-lipid A monoclonal antibody SdJ5-1.17.15. *Infect.Immun.* 61, 3873–3878.
- Galanos, C. und Freudenberg, M. A. (1993). Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action. *Mediators of Inflammation* 2, 11–16.
- Koch, T., Duncker, H. P., Axt, R., Schiefer, H. G., Ackern, K. van und Neuhof, H. (1993). Alterations of bacterial clearance induced by endotoxin and tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 61, 3143–3148.
- Neuhof, H. und Lasch, H. G. (1979). Schock, Mikrozirkulation und Hämostase. *Dtsch.med.Wschr.* 95, 1937–1942.
- Porro, M. (1994). Structural basis of endotoxin recognition by natural polypeptides. *Trends in Microbiol.* 2, 65–67.
- Schimmel, D. (1987). Ergebnisse experimenteller Infektionen von Kälbern mit *Pasteurella multocida* und *Pasteurella haemolytica*. *Arch. experim. Vet. med.* 41, 463–472.

Korrespondenzadresse

Dietrich Schimmel
Naumburger Str. 96a
D-07743 Jena