

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle)
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau PD Dr. B. Schalch

angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Dienststelle Oberschleißheim
(Dr. U. Busch und Dr. H. Beck)

Nachweis von Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli*

und thermophilen *Campylobacter species*

bei Almkühen und in auf Almen produzierten Lebensmitteln

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ute Christine Messelhäuser
aus Nürnberg

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. A. Stolle |
| Referentin: | Priv.-Doz. Dr. B. Schalch |
| 1. Korreferent: | Univ.-Prof. Dr. K. Pfister |
| 2. Korreferent: | Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann |
| 3. Korreferent: | Univ.-Prof. Dr. K. Heinritzi |
| 4. Korreferent: | Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer |

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern, meinem Bruder Markus, meiner Schwägerin Sylvia

sowie meiner Oma und Patin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|--|
| ALTS | Arbeitskreis lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger |
| BfR | Bundesinstitut für Risikoforschung |
| BgVV | Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin |
| BSeuchG | Bundesseuchengesetz (gültig bis 2001) |
| C | <i>Campylobacter</i> |
| c | Konzentration (concentration) |
| CDC | Center of Disease Control (USA) |
| CDT | Cytolethal Distending Toxin |
| DAEC | diffus adhärente <i>E. coli</i> |
| DIG | Dioxigenin |
| DNA | desoxyribonucleinacid |
| dNTP | Desoxynucleotidtriphosphat |
| ds DNA | double strain desoxyribonucleinacid |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EG | Europäische Gemeinschaft |
| EAEC | Enteraggregative <i>E. coli</i> |
| EHEC | Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> |
| EIEC | Enteroinvasive <i>E. coli</i> |
| ELFA | enzyme-linked fluorescence immunoassay |
| EPEC | Enteropathogene <i>E. coli</i> |
| ETEC | Enterotoxische <i>E. coli</i> |
| EU | Europäische Union |
| EWG | Europäische Wirtschaftsgemeinschaft |
| FRET | fluorescence resonance energy transfer |
| GVP | Good Veterinary Practice |
| HUS | hämolytisch-urämisches Syndrom |
| IfSG | Infektionsschutzgesetz (gültig seit 2001) |
| Lactose-TTC | Lactose- 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid |
| LEE | Locus of Enterocyte Effacement |

| | |
|-------------|--|
| LGL | Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit |
| LMBG | Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz |
| MilchV | Milchverordnung |
| mTSB | modifizierte Tryptose-Soja-Bouillon |
| n | Anzahl |
| NRL-Ec | Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor <i>E. coli</i> , Dessau |
| n. u. | nicht untersucht |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| RKI | Robert-Koch-Institut |
| rRNA | ribosomale ribonucleinacid |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| spp. | species |
| SSC | sodium saline citrate |
| ssDNA | single strain desoxyribonucleinacid |
| STEC | Shiga Toxin-bildende <i>E. coli</i> |
| <i>stx</i> | Shiga Toxin-Gen |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris/Borat/EDTA |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TTP | thrombotisch-thrombozytopenische Purpura |
| VTEC = STEC | Verotoxin-bildende = Shiga Toxin-bildende <i>E. coli</i> |
| WHO | World Health Organization |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | LITERATUR | 3 |
| 2.1 | Die Alm- bzw. Alpwirtschaft | 3 |
| 2.2 | Gesetzliche Entwicklungen in Bezug auf Shiga Toxin-bildende <i>Escherichia coli</i> und thermophile <i>Campylobacter species</i> - die EU- Zoonoserichtlinie 2003/99/EG und ihre Umsetzung in deutsches Recht | 5 |
| 2.3 | Molekularbiologische Nachweismethoden für Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> und thermophile <i>Campylobacter species</i> | 6 |
| 2.3.1 | Polymerase Chain Reaction (PCR) | 6 |
| 2.3.2 | Real-Time-PCR | 8 |
| 2.4 | Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> (EHEC) | 12 |
| 2.4.1 | Mikrobiologische Eigenschaften der <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| 2.4.2 | Pathogenitätsfaktoren | 13 |
| 2.4.3 | Postinfektiöse Komplikationen einer EHEC-Infektion | 18 |
| 2.4.4 | Veterinärmedizinische Bedeutung der Shiga Toxin-bildenden <i>E. coli</i> | 19 |
| 2.4.4.1 | Lebensmittelhygienische Sicht | 19 |
| 2.4.4.2 | Bedeutung der Shiga Toxin-bildenden <i>E. coli</i> bei Nutztieren | 22 |
| 2.4.4.3 | Maßnahmen im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens | 23 |
| 2.5 | Thermophile <i>Campylobacter species</i> | 24 |
| 2.5.1 | Mikrobiologische Eigenschaften der thermophilen <i>Campylobacter species</i> | 24 |
| 2.5.2 | Pathogenitätsfaktoren und Übertragungswege | 25 |
| 2.5.3 | Postinfektiöse Syndrome nach einer Campylobacteriose | 27 |
| 2.5.4 | Veterinärmedizinische Aspekte thermophiler <i>Campylobacter species</i> | 28 |
| 2.5.4.1 | Lebensmittelhygienische Sichtweise | 28 |
| 2.5.4.2 | Thermophile <i>Campylobacter species</i> bei Nutztieren | 28 |
| 2.5.4.3 | Maßnahmen im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 31 |
| 3.1 | Thermophile <i>Campylobacter</i> species | 32 |
| 3.1.1 | Untersuchungsmethoden für Rohmilch und andere Lebensmittel | 32 |
| 3.1.2 | Untersuchungsmethoden für Wasserproben | 35 |
| 3.1.3 | Untersuchungsmethoden für Rinderkotproben | 36 |
| 3.1.3.1 | Vorversuch zum Test der verwendeten Untersuchungsmethoden | 36 |
| 3.1.3.2 | Versuchsdurchführung für Rinderkotproben | 36 |
| 3.2 | Shiga Toxin-bildende <i>Escherichia coli</i> (STEC) | 37 |
| 3.2.1 | Untersuchungsmethoden für Rohmilch und andere Lebensmittel | 37 |
| 3.2.1.1 | Mikrobiologische Methodik | 37 |
| 3.2.1.2 | PCR | 38 |
| 3.2.1.3 | Real-Time-PCR | 40 |
| 3.2.1.4 | Kolonieblot-DNA-Hybridisierung | 40 |
| 3.2.2 | Untersuchungsmethoden für Wasserproben | 43 |
| 3.2.3 | Untersuchungsmethoden für Rinderkot- und humane Stuhlproben | 44 |
| 4 | ERGEBNISSE | 45 |
| 4.1 | Status-quo-Untersuchung im Stall | 45 |
| 4.1.1 | Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu | 46 |
| 4.1.2 | Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu | 49 |
| 4.1.3 | Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu | 51 |
| 4.1.4 | Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein | 53 |
| 4.1.5 | Zusammenfassung der Status-quo-Untersuchung im Stall | 55 |
| 4.2 | Erster Untersuchungsdurchgang auf den Almen | 56 |
| 4.2.1 | Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu | 56 |
| 4.2.2 | Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu | 60 |
| 4.2.3 | Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu | 62 |
| 4.2.4 | Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein | 65 |
| 4.2.5 | Zusammenfassung der ersten Probenentnahme auf den Almen | 67 |
| 4.3 | Zweiter Untersuchungsdurchgang auf den Almen | 69 |
| 4.3.1 | Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu | 69 |
| 4.3.2 | Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu | 71 |
| 4.3.3 | Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu | 72 |
| 4.3.4 | Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein | 73 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.3.5 | Zusammenfassung der zweiten Probenentnahme auf den Almen | 74 |
| 4.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse des externen Methodenvergleichs mit dem NRL-Ec, Dessau, in Bezug auf die STEC-Diagnostik | 75 |
| 4.5 | Zusammenfassung der weiterführenden Untersuchungen bei STEC- positiven Proben | 76 |
| 4.5.1 | Zusammenschau der Keimisolierungsergebnisse | 77 |
| 4.5.2 | Zusammenfassung der Serotypisierungsergebnisse | 78 |
| 4.6 | Auswertung der Daten als Verlaufsuntersuchung | 79 |
| 4.6.1 | Thermophile <i>Campylobacter species</i> | 79 |
| 4.6.2 | Shiga Toxin-bildende <i>Escherichia coli</i> (STEC) | 80 |
| | | |
| 5 | DISKUSSION | 81 |
| 5.1 | Interner und externer Vergleich der einzelnen Untersuchungsmethoden | 82 |
| 5.1.1 | Untersuchungsmethoden bei thermophilen <i>Campylobacter species</i> | 82 |
| 5.1.2 | Untersuchungsmethoden für Shiga Toxin-bildende <i>E. coli</i> | 84 |
| 5.1.3 | Externer Methodenvergleich mit dem NRL-Ec, Dessau, in Bezug auf die STEC-Diagnostik | 85 |
| 5.2 | Bewertung der Verlaufsuntersuchung bei drei landwirtschaftlichen Betrieben | 86 |
| 5.2.1 | Verlaufsuntersuchung in Bezug auf thermophile <i>Campylobacter species</i> | 87 |
| 5.2.2 | Verlaufsuntersuchung für Shiga Toxin-bildende <i>Escherichia coli</i> (STEC) | 90 |
| 5.2.3 | Auswertung der Serotypisierungsergebnisse | 92 |
| 5.3 | Kontamination von auf Almen produzierten Lebensmitteln mit Shiga Toxin-bildenden <i>E. coli</i> und thermophilen <i>Campylobacter species</i> | 93 |
| | | |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 99 |
| | | |
| 7 | SUMMARY | 100 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 8 | ANHANG | 101 |
| 8.1. | Anhang zu „Material und Methoden“ | 101 |
| 8.1.1 | Allgemeine Materialien | 101 |
| 8.1.2 | Materialien für Anzucht und Beurteilung von thermophilen <i>Campylobacter</i> species | 103 |
| 8.1.3 | PCR für thermophile <i>Campylobacter</i> species | 106 |
| 8.1.4 | Materialien für Anzucht und Bearbeitung von Shiga Toxin-bildenden <i>E. coli</i> | 107 |
| 8.1.5 | PCR und Real-Time-PCR für Shiga Toxin-bildende <i>E. coli</i> | 114 |
| 8.1.5.1 | PCR | 114 |
| 8.1.5.2 | Real-Time-PCR | 115 |
| 8.2 | Anhang zu „Ergebnisse“ | 117 |
| 8.2.1 | Ergebnisse der Status-quo-Untersuchung im Stall | 117 |
| 8.2.1.1 | Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu | 117 |
| 8.2.1.2 | Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu | 121 |
| 8.2.1.3 | Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu | 125 |
| 8.2.1.4 | Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein | 129 |
| 8.2.2 | Ergebnisse des ersten Untersuchungsdurchganges auf den Almen | 132 |
| 8.2.2.1 | Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu | 132 |
| 8.2.2.2 | Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu | 137 |
| 8.2.2.3 | Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu | 142 |
| 8.2.2.4 | Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein | 146 |
| 8.2.3 | Ergebnisse des zweiten Untersuchungsdurchganges auf den Almen | 150 |
| 8.2.3.1 | Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu | 150 |
| 8.2.3.2 | Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu | 156 |
| 8.2.3.3 | Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu | 161 |
| 8.2.3.4 | Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein | 166 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS | 170 |

1 EINLEITUNG

Thermophile *Campylobacter* spp. und Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) stehen seit 2003 hinter *Salmonella* spp. an zweiter bzw. vierter Stelle der nationalen Statistik für bakterielle Enteritiserreger des Robert-Koch-Institutes (RKI). Betrachtet man die Entwicklung in anderen Ländern der Europäischen Union oder auch Nordamerikas, so ist davon auszugehen, dass die thermophilen *Campylobacter* spp. in den nächsten Jahren *Salmonella* spp. auch in Deutschland an der Spitze dieser Statistik ablösen werden. Im Gegensatz zu Salmonellen können beide oben genannten Bakterien allerdings neben der eigentlichen gastrointestinalen Symptomatik postinfektiöse Syndrome hervorrufen, die bei den betroffenen Patienten zu schweren und langandauernden Beeinträchtigungen führen können. Bei Kleinkindern verläuft das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), das häufig mit einer EHEC-Infektion in Zusammenhang gebracht werden kann, in einigen Fällen trotz aller intensivmedizinischen Möglichkeiten auch heute noch tödlich.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, im Rahmen eines Forschungsprojektes des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Ober- und Niederbayern, gefördert durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, einen Überblick darüber zu erhalten, ob und in welchem Umfang auf Almen produzierte, naturbelassene Lebensmittel wie Rohmilch und Rohmilchkäse mit Shiga Toxin-bildenden *E. coli* (STEC) und thermophilen *Campylobacter* spp. kontaminiert sind. Nach wie vor werden in Bayern während des kurzen Almsommers ca. 4.500 Kühe geälpt. Häufig wird die Milch, die in dieser Zeit anfällt, nicht zur Verarbeitung ins Tal gebracht, sondern direkt auf der Alm an Wanderer und Berghütten abgegeben oder zu Hart-, halbfestem Schnitt- oder Weichkäse sowie Butter verarbeitet. Da inzwischen auch Hochalmen touristisch erschlossen sind, hat sich der Personenkreis, an den diese Lebensmittel verkauft werden, in den letzten Jahren deutlich erweitert. Gerade aber ältere Personen oder Kleinkinder, die heute auch zu den Besuchern von Almen zählen, gehören zu den Risikogruppen für EHEC- bzw. *Campylobacter*-Erkrankungen.

Des Weiteren sollten, neben der oben angesprochenen Fragestellung im Sinne des gesundheitlichen Verbraucherschutzes, auch Erkenntnisse über die Inzidenz und

Prävalenz beider Erreger bei geälpten Kühen gewonnen werden, da bisher keine Daten für diese für den Alpenraum nach wie vor typische Haltungsform vorliegen.

So wurden im Zeitraum von Februar bis September 2004 vier bayerische Milchviehbetriebe jeweils zu drei Zeitpunkten untersucht. Bei einer Untersuchung während der Winterperiode im Stall und zwei Probenentnahmen im Sommer auf den Almen wurden Rinderkot, Milch, Rohmilchkäse, Butter und Proben der Wasserversorgung gewonnen und im Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim, qualitativ mit unterschiedlichen Methoden auf das Vorhandensein von STEC und thermophilen *Campylobacter* spp. untersucht. Ebenso wurde ein Teil der entnommenen Proben parallel zu den eigenen Untersuchungen auf STEC auch an das Nationale Veterinärmedizinische Referenzlabor *E. coli* (NRL-Ec), Dessau, eingesandt. Ziel war es, einen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Detektionsmethoden in den beiden beteiligten Laboren zu erhalten.

2 LITERATUR

2.1 Die Alm- bzw. Alpwirtschaft

Die Alm- bzw. Alpwirtschaft, wie es im Allgäu heißt, gehört zu den ältesten Wirtschaftssystemen in den europäischen Alpenländern. Neuere Forschungen datieren die älteste bekannte Almsiedlung Europas, die Lackenmoosalm im Dachsteingebiet, auf 8.000 bis 2.000 v. Chr. In Berchtesgaden und Traunstein wird Almwirtschaft seit dem 8. Jahrhundert n. Chr. betrieben. Der Grund für die Entwicklung der Almwirtschaft ist in der geringen nutzbaren Fläche in den Tallagen zu sehen, die alleine ein Überleben der bäuerlichen Betriebe nicht sichern konnte. Als Rechtsgrundlage für den Almauftrieb dient auch heute noch das häufig schon Jahrhunderte alte Weiderecht, das an die einzelnen Höfe, nicht an deren Besitzer, gebunden ist. Zwischen dem Grundbesitzer (heute in den meisten Fällen der Freistaat Bayern) und dem Weideberechtigten wird zum einen die genaue Anzahl und Art des aufzutreibenden Viehs (Rinder, Pferde, Ziegen, Schweine und Schafe), zum anderen aber auch der Zeitraum des Jahres, in dem aufgetrieben werden darf, festgelegt (N. N., 2003).

Eine europaweite Agrarkrise führte 1870 nicht nur zu einem massiven Preisverfall landwirtschaftlicher Produkte, sondern auch zu einer Krise der Berglandwirtschaft und somit zur ersten großen Abwanderungswelle der Bauern aus dem Alpenraum; viele der aufgegebenen Bergbauernhöfe wurden in Niederalmen umgewandelt. Die zweite große Abwanderungswelle begann mit Wiederaufbau und Wirtschaftsaufschwung nach dem Zweiten Weltkrieg. Der steigende Bedarf an Arbeitskräften in der Wirtschaft und der weitere Preisverfall zwangen die Landwirte zur Spezialisierung, Intensivierung und einer weitgehenden Mechanisierung der Heimathöfe, ebenso stieg der Anteil der Nebenerwerbsbetriebe deutlich an. Bis in die heutige Zeit gehen auf den Almen die Auftriebszahlen stark zurück, schwer zu bewirtschaftende Grünflächen und Hochalmen werden aufgegeben, viele Milchvieh- in Jungviehalmen ohne Behirtung und Bewirtschaftung umgewandelt (Schwarzelmüller, 1993). Wie viele europäische Länder und private Organisationen bemüht sich die Bayerische Staatsregierung schon lange darum, die Abwanderung aus dem Alpenraum zu stoppen, um bedeutende Traditionen sowie eine attraktive Kulturlandschaft zu erhalten, die im bayerischen Fremdenverkehr eine tragende Rolle spielen. Zu diesem Zweck werden Ausgleichszahlungen und

Geldmittel aus dem Bayerischen Kulturlandschaftsprogramm als Förderinstrumente genutzt (Miller, 2003). Auch die Europäische Union (EU) trägt wesentlich zum Überleben der Almwirtschaft bei. Trotz der deutlichen Förderung haben jedoch viele Klein- und Kleinstbetriebe, wie sie noch im Alpenraum zu finden sind, bei weiterhin fallenden Milch- und Fleischpreisen kaum eine Überlebenschance. Die EU-Osterweiterung, die wahrscheinlich zu einer Verringerung der Fördermittel für die Berglandwirtschaft führen wird, lässt die Zukunftsaussichten der Landwirte in der Almwirtschaft sehr ungewiss erscheinen. Wie sich eine solche Entwicklung auf die bayerischen Almen auswirken könnte, zeigen die Verhältnisse in den französischen Alpen:

Im Talbereich, an den vorteilhaften Standorten, finden sich nur wenige, intensiv bewirtschaftete Großbetriebe, im eigentlichen Gebirge ebenfalls wenige, sehr extensiv betriebene Höfe mit hohen Tierzahlen, die übrige Gebirgslandschaft ist bewaldet oder besteht aus riesigen Brachflächen (Schwarzelmüller, 1993).

Die Traditionen in Bezug auf die Almwirtschaft unterscheiden sich, auch innerhalb Bayerns, von Gebiet zu Gebiet sehr stark:

Im **Allgäu** sind im etwa 100 Tage dauernden Alpsommer die Alphirten (Senner) für das Wohlergehen der Tiere verantwortlich. Weibliches Jungvieh wird auf „Galtalpen“, auf denen keinerlei Möglichkeit zum Melken vorhanden ist, aufgetrieben; diese können als Hochalpen bis auf 2000 m ü. d. M. liegen. Milchkühe findet man dagegen entweder auf „Kualpen“, von denen die Milch zur Weiterverarbeitung ins Tal geliefert wird, oder auf höher gelegenen „Sennalpen“, auf denen die Milch direkt durch den Senn verarbeitet wird. Ebenso gibt es in dieser Region noch sehr häufig sogenannte „Mischalpen“, auf denen neben Milchkühen auch Mastschweine, Esel und Pferde gehalten werden. Häufig handelt es sich um Genossenschaftsalpen, die mit Tieren unterschiedlicher Landwirte beschlagen werden. Aus dieser Tatsache heraus entwickelte sich der Brauch der „Vihscheid“, d. h., dass das Vieh bunt geschmückt von der Alpe abgetrieben und auf einem großen Platz „geschieden“, d. h. wieder den Eigentümern zugeteilt wird. Die Vihscheid, für das Jungvieh am 12. oder 13. September, für die Kühe spätestens am Matthäustag (21. September), ist in den einzelnen Gemeinden in der Regel mit einem großen Volksfest verbunden.

In **Traunstein** und **Berchtesgaden** findet man vermehrt Sennerinnen auf den Almen; junge Männer sind in diesem Beruf eher selten. Gemeinschaftsalmen existieren auch in dieser Gegend, allerdings etwas anders angelegt als im Allgäu. Zumeist hat jeder Landwirt seine eigene „Kaser“ (Almhütte) und somit auch eine eigene Sennerin, die ausschließlich für seine Tiere verantwortlich ist. Allerdings stehen die „Kaser“ mehrerer Landwirte häufig auf einer Hochalm zusammen. Insofern entfällt in Traunstein und Berchtesgaden die traditionelle „Viehscheid“, wie sie im Allgäu üblich ist. Der Almatrieb wird aber auch hier mit einem großen Fest begangen, wobei die Kühe teilweise auf abenteuerliche Weise nach Hause geholt werden müssen, z. B. mit Booten quer über den Königssee.

2.2 Gesetzliche Entwicklungen in Bezug auf Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* und thermophile *Campylobacter species* - die EU-Zoonose-Richtlinie 2003/99/EG und ihre Umsetzung in deutsches Recht

Die Richtlinie 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern führte durch ihr In-Kraft-Treten am 17. November 2003 zur Aufhebung der alten EU-Zoonose-Richtlinie 92/117/EWG. Zu den nach Anhang I, Teil A überwachungspflichtigen Zoonosen und Zoonoseerregern zählen nach der neuen Richtlinie auch „Campylobacteriose und ihre Erreger“ und „Verotoxinbildende *Escherichia coli*“ (Europäisches Parlament und Europäischer Rat, 2003). Gemäß Artikel 4 ist in den einzelnen Mitgliedsstaaten eine Überwachung der in Anhang I, Teil A genannten Zoonoseerreger auf der Ebene der Primärproduktion und/oder auf anderen Stufen der Lebensmittelkette vorgesehen. Die Umsetzung dieser Richtlinie soll in Deutschland vor allem in Bezug auf *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* über die Einführung einer Meldepflicht bei Auftreten einer Erkrankung oder des Erregernachweises bei den relevanten Tierarten (vor allem Hühner und Rinder, aber auch Heimtiere) erfolgen (Schneider, 2004).

Die neue Zoonose-Richtlinie dient überwiegend der Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten, die zum Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern in den einzelnen Mitgliedsstaaten erhoben werden. Dadurch soll eine Gefahrenerkennung und eine Einschätzung der Gesundheitsrisiken, die von den in Anhang I aufgeführten Erregern ausgehen, ermöglicht werden. Aufgrund der erhobenen Daten kann

die EU-Kommission genaue Vorschriften für einzelne Untersuchungsmethoden und Bekämpfungsmaßnahmen erlassen. Insgesamt ist es Ziel dieser Richtlinie, den Schutz des Verbrauchers zu verbessern und einheitliche Standards in der Europäischen Union zu gewährleisten (Schneider, 2004).

2.3 Molekularbiologische Nachweismethoden für Enterohämorrhagische *Escherichia coli* und thermophile *Campylobacter species*

2.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine In-vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Diese Technik geht auf Kary Mullis zurück, der 1993 für seine Entdeckung den Nobelpreis für Chemie erhielt.

Mit Hilfe der PCR lassen sich gesuchte DNA-Sequenzen, z. B. bestimmte Pathogenitätsgene von Bakterien, vervielfältigen, danach durch Agarosegelelektrophorese auftrennen und mit Hilfe einer Ethidiumbromidfärbung nachweisen. Die PCR ist eine einfache und inzwischen in vielen diagnostischen Labors etablierte Technik, mit der sich u. a. sowohl bakterielle als auch virale DNA in unterschiedlichen biologischen Materialien nachweisen lässt und die zugleich hochspezifisch arbeitet, das heißt, es ist bereits der Nachweis eines einzigen bakteriellen oder viralen Genoms möglich (Streuer, 1996).

Vor allem zwei Entwicklungen führten zum Erfolg der PCR: Der Einsatz der hitzestabilen DNA-Polymerasen und die Erfindung von Geräten, die einen zyklischen Temperaturwechsel ermöglichen (Thermocycler). Folgende Schritte laufen im Thermocycler vollautomatisch mit einer exakt reproduzierbaren Temperaturregulation für alle Proben ab (Newton und Graham, 1997):

- Denaturierung der doppelsträngigen DNA in einer Lösung mit Primern, den vier Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs), dem Reaktionspuffer und einer hitzestabilen DNA-Polymerase (93° C - 100° C)
- Annealing der Oligonucleotidprimer an die denaturierte Matrize (37° C - 65° C in Abhängigkeit von den eingesetzten Primern)

- Verlängerung der Primer durch die hitzestabile DNA-Polymerase bei 72° C

Die genannten drei Schritte werden zu einem PCR-Zyklus zusammengefasst. Die Anzahl der Zyklen liegt in der Regel zwischen 25 und 40. Mit steigender Anzahl der Zyklen nimmt allerdings auch die Anzahl der unerwünschten Artefakte zu, ohne dass sich die Menge der Ziel-DNA entscheidend erhöht. So werden selten mehr als 45 Zyklen verwendet (Newton und Graham, 1997).

Am häufigsten wird, wie auch in den nachfolgend beschriebenen Versuchen, *Taq*-DNA-Polymerase für die PCR eingesetzt. Die *Taq*-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym, das aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus* gewonnen wird, welcher aus einer heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark isoliert wurde (Streyer, 1996). Inzwischen gibt es aber auch die Möglichkeit, *Taq*-Polymerase gentechnisch herzustellen. Die optimale Arbeitstemperatur dieses Enzyms liegt zwischen 70° C und 80° C; bei dieser Temperatur erreicht es eine Synthesegeschwindigkeit von 35 bis 100 Nucleotiden pro Sekunde. Die gentechnische Variante der *Taq*-Polymerase, die durch Expression des verantwortlichen Gens in *E. coli* hergestellt wird, trägt die Bezeichnung Amplitaq®. Dieses Enzym kann wesentlich leichter in hochreiner Form gewonnen werden als die *Taq*-Polymerase und ist somit für die meisten PCR-Ansätze heute die Polymerase der Wahl. Da die Expression und Produktion allerdings in *E. coli* erfolgt, ist es ratsam, bei der Amplifikation bakterieller DNA mit zu *E. coli* homologen DNA-Sequenzen auf *Taq*-Polymerase oder hochgereinigte Amplitaq®-Versionen zurückzugreifen, um Verunreinigungen des PCR-Ansatzes mit DNA aus der Enzymlösung zu verhindern (Newton und Graham, 1997).

Die für die PCR benötigten Puffer sind kommerziell in Kombination mit der *Taq*-Polymerase erhältlich. Zum Teil enthält der Puffer bereits die entsprechende Menge $MgCl_2$, zum Teil muss es in der passenden Konzentration noch zugesetzt werden. Mg^{2+} -Ionen bilden gemeinsam mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der den Einbau der dNTPS ermöglicht. Zusätzlich kann die $MgCl_2$ -Konzentration die Polymeraseaktivität stimulieren. Generell geht man davon aus, dass eine zu geringe $MgCl_2$ -Konzentration die PCR-Ausbeute verringert, eine zu hohe Konzentration dagegen die Bildung unspezifischer Produkte fördert (Newton und Graham, 1997).

2.3.2 Real-Time-PCR

Im Gegensatz zur PCR erlaubt die Real-Time-PCR die Messung der entstehenden PCR-Produkte bereits während des PCR-Laufs mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (Sagner et al., 1999). Dabei gibt es unterschiedliche Verfahren:

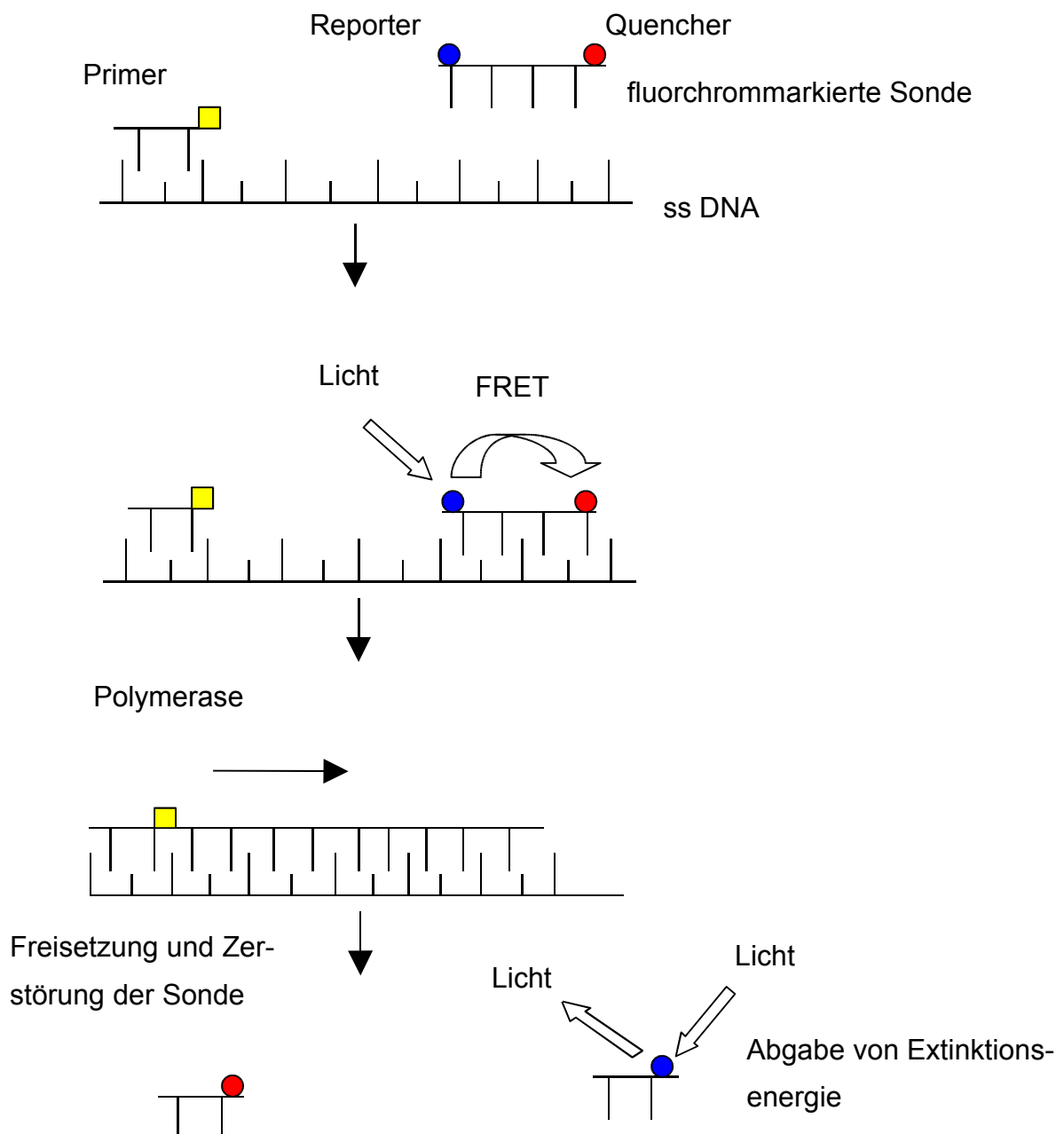
Die einfachste Methode beruht auf der Zugabe von SYBR Green, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die dsDNA interkalieren kann. So kommt es bei Fortschreiten der PCR zu einem Anstieg der Fluoreszenz (de Silva et al., 1998). Allerdings reagiert dieser Farbstoff nicht spezifisch mit der zu untersuchenden DNA-Sequenz, so dass auch Primer-Dimere, die sich während der PCR bilden können, eine Fluoreszenz aufweisen. Durch eine anschließende Schmelzkurvenanalyse, wie sie mit einigen Geräten, z. B. dem LightCycler® (Firma Roche Diagnostic) möglich ist, kann eine Differenzierung zwischen den unspezifischen Primer-Dimeren und den erwünschten DNA-Amplifikaten vorgenommen werden. Dazu wird nach Abschluss der PCR die Temperatur kontinuierlich erhöht, bis die PCR-Produkte gemäß ihres Schmelzpunktes nur noch als Einzelstränge vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird gemessen. Die wesentlich kleineren Primer-Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die spezifischen Sequenzen (Rottengatter, 2003). Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass jede durchgeführte Untersuchung einer Bestätigungreaktion bedarf, da keine sequenzspezifische Detektion durchgeführt wird.

Ein weiteres Verfahren, das auch für die vorliegenden Versuche eingesetzt wurde, arbeitet mit fluoreszenzmarkierten Sonden. Das Prinzip beruht auf einer normalen PCR mittels zweier genspezifischer Primer, die zur Vervielfältigung des gesuchten DNA-Fragments eingesetzt werden. Je nachdem aber, welche Art von Sonden verwendet wird, unterscheiden sich die einzelnen Assays in ihrem weiteren Ablauf.

Bei Verwendung des **TaqMan-Assays** kommt **eine** doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde zum Einsatz, die am 5`-Ende einen Reporter (Donor-Fluorchrom) und am 3`-Ende einen Quencher (Akzeptor-Fluorchrom) trägt. Das Donor-Fluorchrom wird durch Licht angeregt und gibt die entstehende Extinktionsenergie an das Akzeptor-Fluorchrom ab. Dieses Prinzip, das u. a. dem Einsatz von **Hydrolysesonden** zugrunde liegt, bezeichnet man als **f**luorescence **r**esonance **e**nergy **t**ransfer (FRET). Der FRET

kann nur dann stattfinden, wenn Reporter und Quencher in einem definierten Abstand voneinander liegen. Sobald die räumliche Nähe zwischen den beiden Fluorchromen aufgehoben wird, weil es durch die fortschreitende Elongation des neusynthetisierten DNA-Stranges in Verbindung mit der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase zu einer Freisetzung und letztlich Zerstörung der Sonde kommt, gibt der Reporter die Extinktionsenergie an die Umgebung ab. Dieser Fluoreszenzanstieg kann durch das Real-Time-PCR-Gerät detektiert werden (Busch, 2002, Rottengatter, 2003).

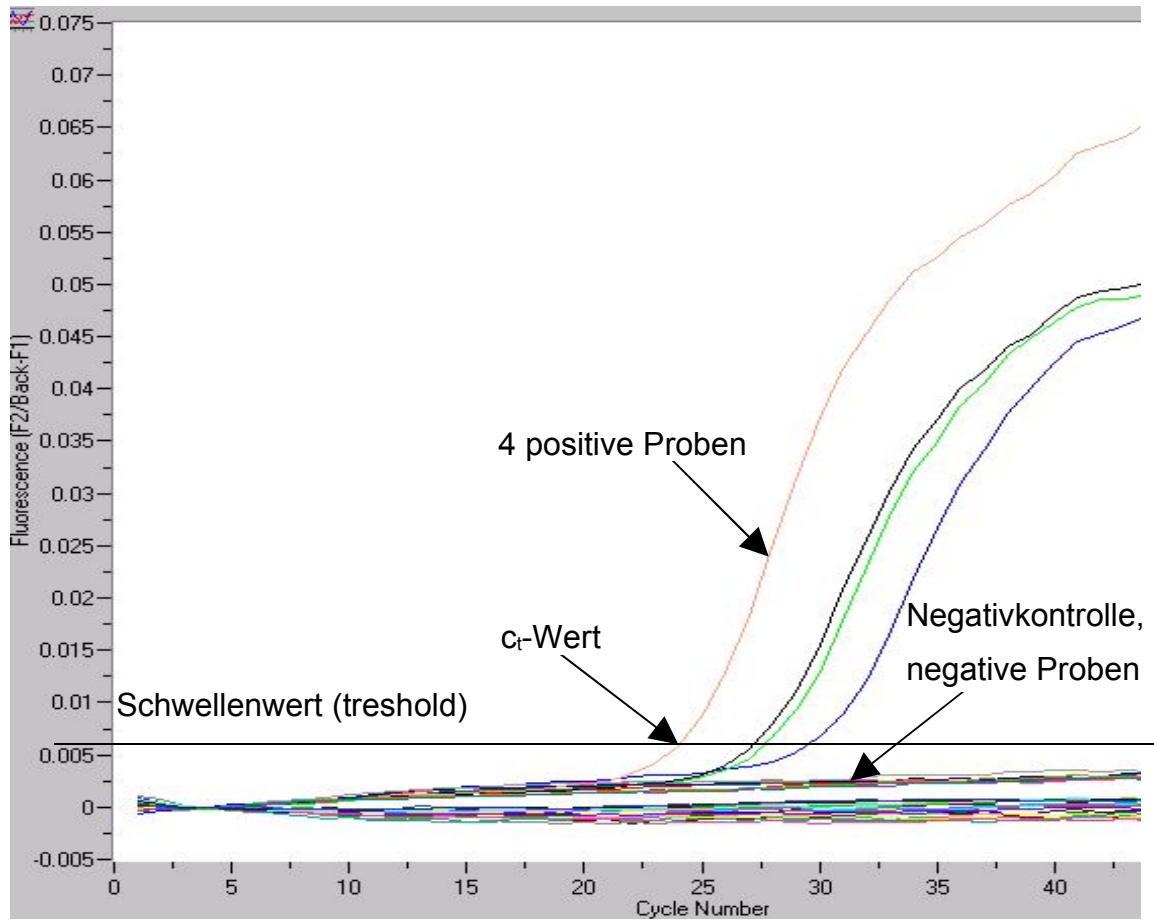
Abbildung 1: Funktionsprinzip der Real-Time-PCR (TaqManAssay)



Hybridisierungs sonden dagegen werden u.a. für die LightCycler®-Technik verwendet. Zum Einsatz kommen hier **zwei** fluoreszenzmarkierte Sonden, die eine trägt das Donor-Fluorchrom am 5`-Ende, die andere das Akzeptor-Fluorchrom am 3`-Ende. Beide Sonden müssen nun in einem definierten Abstand zueinander an die DNA binden, damit wiederum ein FRET stattfinden kann. Angeregt von einer externen Lichtquelle überträgt das Donorfluorchrom Energie auf das Akzeptorfluorchrom. Dieses wiederum emittiert Extinktionsenergie in Form von Fluoreszenz, die durch das Real-Time-Gerät gemessen werden kann. Vorteil dieses Assays ist, dass es zusätzlich für eine Schmelzkurvenanalyse genutzt werden kann (de Silva et al., 1998, Sagner et al., 1999).

Ein Vorteil, der die Real-Time-PCR gegenüber der PCR auszeichnet, liegt in der erfolgreichen Online-Detektion. Jeder einzelne Zyklus kann am Computer mitverfolgt werden. Ein weiterer Vorteil ist in dem Fehlen der „carry over“-Kontamination mit PCR-Produkten zu sehen, der bei einer sich der PCR anschließenden Gelelektrophorese nie völlig ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren ermöglicht die mit einigen Geräten durchführbare Schmelzkurvenanalyse eine Feindifferenzierung der Proben. Schließlich führt die Real-Time-PCR im Vergleich zur konventionellen PCR zu einer Arbeits erleichterung, bedingt durch den Wegfall der Gelelektrophorese, und einem Zeitvorteil von ein bis zwei Stunden (Rottengatter, 2003).

Abbildung 2: Beispiel für ein Real-Time-PCR-Ergebnis beim Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden (LightCycler®)



c_t = „threshold cycle“: berechnete Zyklus-Zahl, an der das PCR-Produkt die Nachweis-Grenze überschreitet

2.4 Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

2.4.1 Mikrobiologische Eigenschaften der *Escherichia coli*

Die Bakterienspezies *Escherichia coli*, 1885 zum ersten Mal durch den Kinderarzt Escherich aus Stuhlproben von Säuglingen isoliert, zählt zu den gramnegativen, nicht sporenbildenden Stäbchenbakterien. Kapselbildung und peritriche Begeißelung finden sich bei den meisten Stämmen; es kommen aber auch unbegeißelte und damit unbewegliche Stämme vor (Karch et al., 1996). *E. coli* stellen keine besonderen Ansprüche an das Substrat und wachsen auf vielen gebräuchlichen Nährböden bei Temperaturen zwischen 30° C und 45° C. Die Anzucht kann routinemäßig auf Agar-Nährböden erfolgen, auf denen *E. coli* entweder in grau-weißlichen Kolonien mit glattem Rand, der sogenannten S-Form, oder aber in kleineren matten Kolonien mit gezacktem Rand, der R-Form wachsen (Kayser, 1998, Selbitz, 2002). Bei spezielleren Fragestellungen werden Blutagar, Mueller-Hinton-Agar oder Selektivnährböden, wie zum Beispiel ENDO- oder Rapid *E. coli* (REC)-Platten bevorzugt. ENDO-Platten, 1904 von Endo zum ersten Mal zum Nachweis von „Thyphusbacillen“ eingesetzt, enthalten Natriumsulfit und Fuchsin als Fuchsin-sulfit-Verbindung. Beide Substanzen sind zum einen in der Lage, das Wachstum grampositiver Bakterien zu hemmen, zum anderen reagiert Fuchsin mit dem Aldehyd, den *E. coli* und Coliforme bei der Fermentation von Lactose freisetzen, löst sich aus der Verbindung und führt zu einer Rotfärbung der Kolonien. Dieser Reaktionsmechanismus ist beim Wachstum von *E. coli* so stark, dass Fuchsin auskristallisiert und die Kolonien einen grünschimmernden Metallglanz erhalten (N.N., 1996). Allerdings finden sich unter den *E. coli* auch einige Stämme, die Lactose-negativ sind und somit nicht über diesen Selektivnährboden nachgewiesen werden können. Betrachtet man die übrigen biochemischen Fähigkeiten der *E. coli*, so zeigt sich, dass die überwiegende Anzahl der Stämme Katalase bildet, allerdings weder über eine Cytochromoxidase noch über die Fähigkeit zur H₂S-Bildung verfügt. Ein Nachweis dieser Eigenschaften ist über die Spaltung von H₂O₂ (Katalase) oder die Oxidation einer Phenylendiamin-Verbindung (Cytochromoxidase) möglich (Bettelheim, 1994).

Eine weitere Unterteilung und Typisierung der Stämme erfolgt über die jeweils vorhandenen O-, K- und H-Antigene. Bei O, H und K handelt es sich um Bestandteile der Zellwand (O), der Geißel (H) oder der Kapsel (K). Die Kapsel, die *E. coli* ausbildet,

ist, zusammen mit einigen Zellwandantigenen, für die Serumresistenz der Bakterien verantwortlich, die für die Überlebensfähigkeit im Blut eines Patienten von entscheidender Bedeutung ist. Entweder wird eine Komplementaktivierung völlig unterbunden oder die Ablagerung des aktivierten Komplementkomplexes in der bakteriellen Zellwand verhindert (Rolle und Mayr, 1993). Man kann gegenwärtig über 170 O-, ca. 100 K- und 56 H-Antigene differenzieren, was zu mehr als 10.000 Kombinationsmöglichkeiten führt.

Viele *E. coli*-Stämme besiedeln als Kommensalen den Darm von Mensch und Tier bereits wenige Stunden nach der Geburt und liefern dem Körper wichtige Stoffwechselprodukte, die zum Beispiel für die Blutgerinnung benötigt werden. Allerdings gehören nicht alle *E. coli* zu den für den Menschen ungefährlichen Bakterien. Bestimmte Erregerstämme führen zu einem breiten Spektrum von Erkrankungen, das von einer harmlosen Reisediarrhöe bis hin zu lebensgefährlichen Krankheitsbildern wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) reicht (Ammon et al., 2000). In Beziehung zu einigen O-Antigenen treten gehäuft plasmidkodierte Virulenzfaktoren, wie die Befähigung zur Hämolysin- oder Enterotoxinbildung, auf, die eine Unterteilung der Stämme in Subtypen ermöglicht. Nach heutigem Wissensstand unterscheidet man hier zwischen:

- Enterotoxischen *E. coli* (ETEC)
- Enteropathogenen *E. coli* (EPEC)
- Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)
- Enteroinvasiven *E. coli* (EIEC)
- Enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) und
- Diffus adhärenenten *E. coli* (DAEC)

Unter diesen Pathovaren haben EHEC, neben EPEC, die überwiegend bei Kindern unter zwei Jahren angetroffen werden, wahrscheinlich die weitaus größte Bedeutung (RKI, 2000).

2.4.2 Pathogenitätsfaktoren

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) zählen in der Bundesrepublik Deutschland inzwischen neben Salmonellen und thermophilen *Campylobacter* spp. zu

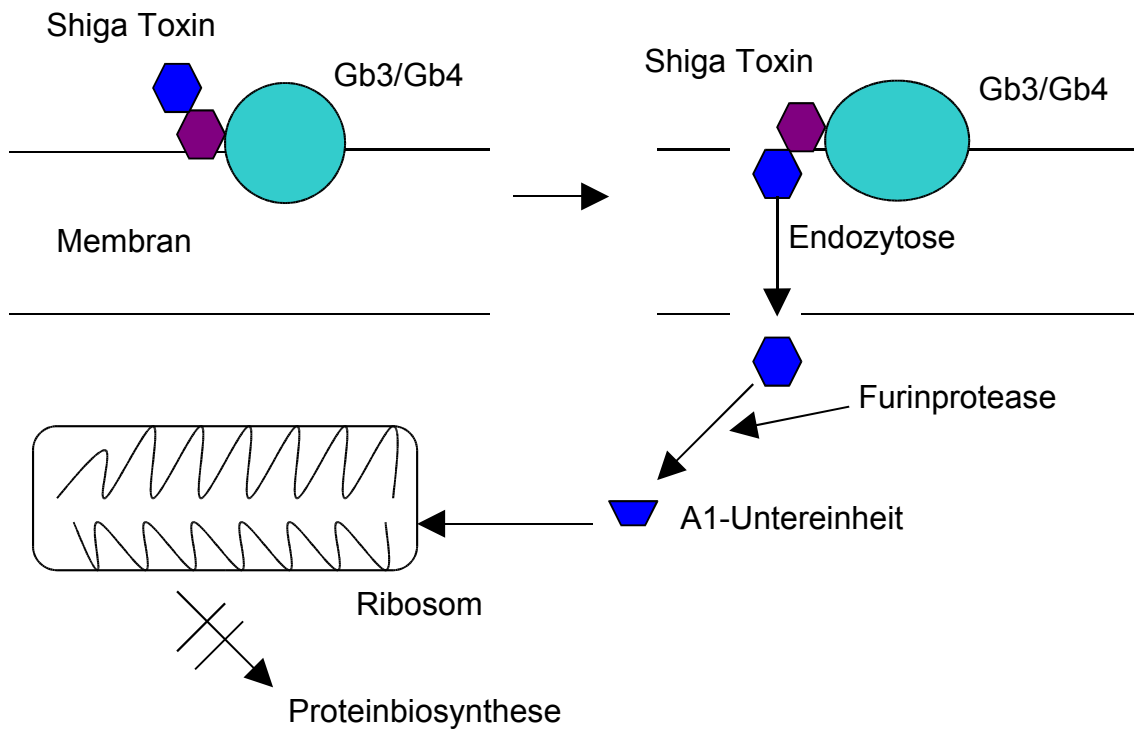
den häufigsten bakteriellen Enteritiserregern (RKI, 2003). Zu den Eigenschaften dieser Bakterien rechnet man die Fähigkeit, Shiga Toxin (auch als Shiga-like-Toxin oder Verotoxin bezeichnet) zu produzieren, was ihnen die Bezeichnung Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) oder Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC) eingebracht hat. Die Symptome einer EHEC-Infektion beim Menschen können von einer akuten Enteritis über eine hämorrhagische Colitis bis hin zu häufig tödlich endenden postinfektiösen Syndromen, dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) mit oder ohne zerebrale Begleiterscheinungen, reichen (Karch et al., 1996). Betroffen von den oben genannten Komplikationen sind zumeist (Klein-)Kinder und ältere Menschen. Unter dem Begriff EHEC im engeren Sinn versteht man STEC, die zu den vorher genannten Erkrankungen beim Menschen führen können. Da es aber mit den bislang vorhandenen Untersuchungsmethoden nicht möglich ist, eindeutig zwischen EHEC und STEC zu differenzieren, werden im Moment alle beim Menschen gefundenen Isolate als EHEC, alle bei Tieren gefundenen Isolate mit den Synonyma STEC oder VTEC bezeichnet (Frank und Alpers, 2003, Lehmann et al., 2003).

Die Unterteilung der EHEC in Serovare erfolgt seit Jahrzehnten nach der O:K:H-Seroformel. Diese Antigendefinition gilt nicht nur für die Gattung *Escherichia*, sondern auch beispielsweise für Salmonellen und viele andere Bakterien. Der Nachweis eines bestimmten Serovars oder speziell O-Antigens gibt in vielen Fällen einen Hinweis auf die Virulenz des isolierten Stammes. Auch für epidemiologische Untersuchungen werden solche Unterscheidungsmerkmale genutzt. So können die Antigene als indirekte Virulenzfaktoren interpretiert werden (Selbitz, 2002).


Nach den Surveillancedaten des RKI, erhoben im Zeitraum von 2001 bis 2003, wurde bei 47 % der gemäß Infektionsschutzgesetz (IfSG) gemeldeten humanen EHEC-Erkrankungen eine O-Antigentypisierung durchgeführt. Diese ergab, dass O157 (39 %), O103 (31 %), O26 (21 %) und O91 (9 %) in der Mehrzahl der Fälle für eine Erkrankung verantwortlich waren (Frank et al., 2004). Anders als in den USA und Großbritannien nehmen in Deutschland somit Stämme des Serovars O157:H7 keine unangefochtene Vormachtstellung ein (Beutin et al., 1998). Ebenso stößt man bisher nur in Deutschland häufiger auf einen besonderen Klon von EHEC O157:H7, der in der Lage ist, Sorbit zu vergären und β -Glucuronidase zu produzieren. Die größten HUS-Ausbrüche in Deutschland konnten seit 1988 auf eben diesen Klon zurückgeführt werden (Karch, 2004).


Wie bereits erwähnt, geht der Name STEC auf die Fähigkeit zur Bildung unterschiedlicher Zytotoxine, der Shiga Toxine zurück (Karch et al., 1996). Eine einheitliche Nomenklatur für die unterschiedlichen Toxintypen konnte sich bislang in der wissenschaftlichen Fachwelt noch nicht durchsetzen; eine mögliche Lösung wäre daher die von Calderwood et al. (1996) publizierte und von der American Society for Microbiology übernommene Nomenklatur. Demnach bleibt die Bezeichnung Shiga Toxin für die Toxine des Genus *Shigella* bestehen. Die zurzeit bekannten zwei Shiga Toxingruppen von *E. coli* tragen die Namen Shiga Toxin 1 (*stx1*) und Shiga Toxin 2 (*stx2*), wobei als Varianten des Shiga Toxin 1 ein Shiga Toxin 1c und 1d (Zhang et al., 2002, Bürk et al., 2003), als Varianten des Shiga Toxin 2 die Shiga Toxine 2c, 2d, 2e und 2f gefunden wurden (Weinstein et al., 1988, Schmidt et al., 2000, Brett et al., 2003). Molekularbiologisch gesehen ist das Shiga Toxin 1 nahezu identisch mit dem Shiga Toxin, das sich bei *Shigella dysenteriae* findet. Shiga Toxin 2 dagegen zeigt nur eine etwa 60 %ige Aminosäure-Sequenzhomologie zu Shiga Toxin 1 auf (Friedrich, 2002). Shiga Toxine haben verschiedene Eigenschaften, die zu ihrer Rolle im Krankheitsverlauf beitragen; so wirken sie zytotoxisch, enterotoxisch und neurotoxisch. Die Enterotoxizität ist u. a. für den „milderer“ Verlauf einer EHEC-Erkrankung, die akute Enteritis, verantwortlich, während die Zytotoxizität zu einer hämorrhagischen Colitis und in letzter Konsequenz auch zum hämolytisch-urämischen Syndrom führt. Bezogen auf ihre Wirkungsweise zählen die Shiga Toxine, ähnlich wie das Cholera-Toxin, zu den AB-Toxinen, d. h. sie bestehen aus einer B-Untereinheit für die spezifische Bindung an die Oberfläche ihrer Zielzellen und einer A-Untereinheit als eigentlicher Wirkkomponente (Karmali, 1989, Kayser et al., 1997). Betrachtet man die zytotoxische Wirkungsweise, binden die unterschiedlichen Shiga Toxin-Varianten mittels ihrer B-Untereinheiten an bislang zwei bekannte Rezeptoren der Endothelzellen: Shiga Toxin 1, 2 und 2c an Globotriaosylceramid 3 (Gb3) und Shiga Toxin 2e an Globotetraosylceramid 4 (Gb4). Für die übrigen Varianten sind die Rezeptoren noch unbekannt. Über die Rezeptoren erfolgt eine Endozytose des Toxins ins Zellinnere, wo eine membranständige Furinprotease die A-Untereinheit spaltet. Es entsteht ein aktives A1-Fragment, das in der Lage ist, die Proteinsynthese der Zelle zu blockieren (Karmali, 1989, Friedrich, 2002).


Abbildung 3: Skizze des Funktionsmechanismus der Shiga Toxine (Zytotoxizität):



Legende:

 B-Untereinheit des Shiga Toxins

 A-Untereinheit des Shiga Toxins

 A1-Untereinheit mit der Funktion einer rRNA-N-Glykosidase

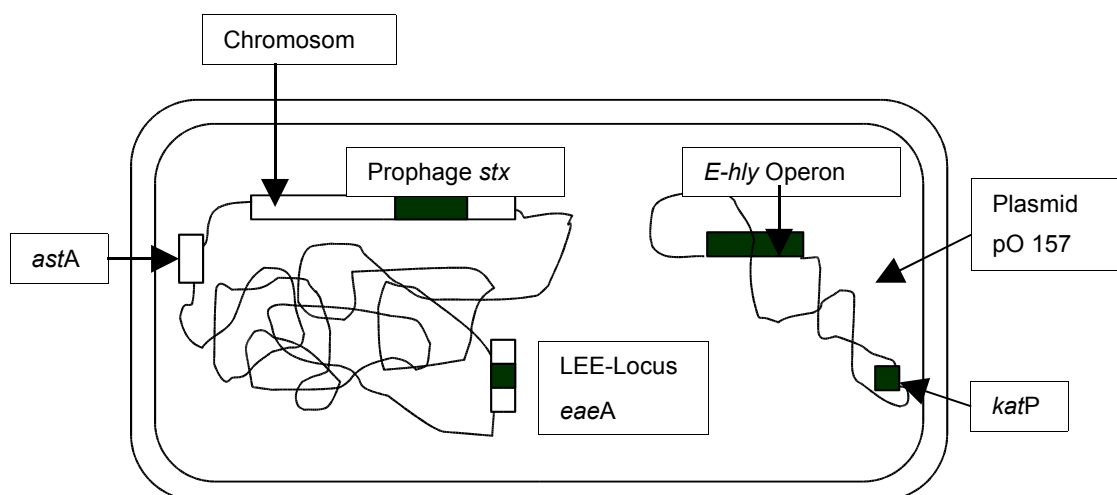
Die Verbreitung der einzelnen STEC variiert gemäß der unterschiedlichen Toxinbildung. Während Shiga Toxin 1, 1c, 2, 2c und 2d überwiegend aus *E. coli* humaner Stuhlproben und Rinderkotproben, selten auch bei Schafen, isoliert wurde, findet sich Shiga Toxin 2e fast ausschließlich bei Schweinen mit Ödemkrankheit (Weinstein et al., 1988) und nur selten in humanen Isolaten, die dann auch anderen Serogruppen angehören. Shiga Toxin 2f wiederum konnte bis jetzt nur in Taubenisolaten, nicht aber bei humanen Serogruppen nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2000, Friedrich, 2002). In einer Studie des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), die den Zeitraum vom 01.04.1996 bis zum 31.03.2002 umfasst, konnten bei den 1147 humanen EHEC- Erkrankungen, die mittels

PCR untersucht wurden, in 456 Fällen (40 %) nur *stx1*, in 361 (31 %) nur *stx2* und in 330 (29 %) Fällen sowohl *stx1* und *stx2* nachgewiesen werden (Morlock, 2002).

Neben den beiden Shiga Toxin-Typen *stx1* und *stx2* sind *E. coli*-Stämme, ebenso wie viele andere Bakterien in der Lage, Cytolethale distending toxins (CDTs) zu produzieren. Fünf unterschiedliche *cdt* Allele wurden bis jetzt in *E. coli* entdeckt, wobei bei einzelnen Serotypen *cdt* chromosomal-, bei anderen plasmidkodiert ist. Die Pathogenität einiger Non-O157-Stämme könnte auf die CDT-Aktivität zurückzuführen sein (Janka et al., 2003, Bielaszewska, 2004).

Weitere Pathogenitätsfaktoren, die auch zur Charakterisierung von EHEC genutzt werden, sind das Hämolysin *hly*-Gen (*E-hly*), das für ein porenbildendes Zytotoxin kodiert und das Intimin *eae*-Gen. Während *E-hly* auf dem Plasmid pO157 lokalisiert ist, findet sich das *eae*-Gen ebenso wie die Shiga Toxin-Gene im Chromosom des Bakteriums. Das *eae*-Gen ist Teil des LEE (Locus of Enterocyte Effacement), der wichtigsten und verbreitetsten Pathogenitätsinsel darmpathogener *E. coli*, der für ein Typ III-Sekretionssystem, ein Adhäsin (Intimin) und verschiedene über das Typ III-Sekretionssystem sezernierte Proteine kodiert. Diese Gene sind für die Ausbildung von Attaching-and-Effacing-(AE-)Läsionen am Darmepithel verantwortlich (Karch und Kohler, 1999, Perna et al., 2001, Kirsch et al., 2004, Bertin et al., 2004).

Abbildung 4: Virulenzfaktoren von EHEC



(nach Karch et al., 1996, Allerberger et al., 1997)

2.4.3 Postinfektiöse Komplikationen einer EHEC-Infektion

Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) (Originalbeschreibung 1955 durch den Pathologen Gasser und den Schweizer Kinderarzt Gautier) ist durch eine hämolytische Anämie, Thrombopenie und ein akutes Nierenversagen gekennzeichnet. Die Inzidenz beträgt 0,7 bis 1,0 Fälle pro 100.000 Kinder unter 15 Jahren in Deutschland und Österreich, die Letalität liegt immer noch bei ein bis drei Prozent der Fälle (Zimmerhackl, 2004), etwa ein Drittel der Patienten wird dialysepflichtig. Auch wenn inzwischen andere Ursachen für HUS bekannt sind, wird die überwiegende Anzahl der auftretenden Fälle im Kindesalter mit EHEC assoziiert (Karmali et al., 1985). Als Langzeitkomplikationen sind eine persistente Proteinurie, Hämaturie, eine arterielle Hypertonie sowie dauerhafte Einschränkungen der Nierenfunktion beschrieben. Auch ein rekurrenzierendes HUS (rechHUS) ist, vor allem bei Kleinkindern, möglich. Die Pathogenese des rechHUS ist bis jetzt noch nicht geklärt. Man geht aber davon aus, dass neben der auslösenden EHEC-Infektion eine pathologische Komplementaktivität vorliegen muss, um diese durch zahlreiche Rezidive gekennzeichnete Erkrankung auszulösen (Prüfer, 2004). Eine zeitliche Obergrenze, in der eine dieser Komplikationen auftreten kann, gibt es nicht; in der Literatur finden sich auch Zeiträume von bis zu 15 Jahren (Brandis et al., 2002).

Der genaue Mechanismus der EHEC-assoziierten HUS ist nach wie vor nicht in allen Details geklärt; allerdings kennt man inzwischen die wichtigsten Pathogenitätsmechanismen:

Aufgrund der oben beschriebenen Pathogenitätsfaktoren der EHEC gelangen Shiga Toxin und Lipopolysaccharide aus dem Darm in den Blutkreislauf. Endothelzellen werden aktiviert, was eine Ausschüttung von Interleukin 1, 6, 8, 10 und $TNF\alpha$ sowie eine Schädigung der Endothelzellen nach sich zieht. Des Weiteren kommt es zu einer Freisetzung des von-Willebrand-Faktors und einer Aktivierung der Gerinnungskaskade. Ein lokaler Verbrauch der Thrombozyten am Endothel führt zu einer generalisierten Thrombozytopenie. Diese Reaktion findet überwiegend in den Kapillaren der Niere statt und bedingt dort eine Kongestion der glomerulären Kapillaren. Die lokale Schädigung des Epithels in der Niere führt zu einer akuten tubulären Nekrose (Brandis et al., 2002).

Die Trennung zwischen HUS und der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), einer weiteren postinfektiösen Komplikation der EHEC-Infektion, ist nach heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen nur noch aus historischer Sicht berechtigt, so dass inzwischen von HUS/TTP gesprochen wird. Bei der lokalen Thrombenbildung, die durch eine aktivierte Gerinnung ausgelöst wird, spielt der von-Willebrand-Faktor eine wichtige Rolle. Man geht davon aus, dass die Protease, die normalerweise für die Auflösung des von-Willebrand-Faktor-Aggregats verantwortlich ist, durch Antikörper gehemmt wird, was eine aktivierte Gerinnung nach sich zieht (Brandis et al., 2002).

1996 wurde zuerst in Bayern, ab November 1998 dann aufgrund des § 3 BSeuchG deutschlandweit eine Meldepflicht für EHEC-Infektionen und HUS-Erkrankungen eingeführt, wobei eine Vielzahl von EHEC-Erkrankungen, die nur mit einer akuten Enteritis einhergehen, anders als HUS, wohl nicht erfasst werden dürften. Nach den statistischen Erhebungen des RKI wurden im Jahr 2003 1.135 EHEC-Erkrankungen (außer HUS) und 81 HUS-Fälle registriert (RKI, 2003).

Tabelle 1: Surveillance-Daten des Robert-Koch-Institutes für EHEC und HUS (BSeuchG bis 2000/IfSG ab 2001):

| Art der Erkrankung | Erkrankte Personen | | | | |
|--------------------|--------------------|------|------|------|------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 |
| EHEC (ohne HUS) | 982 | 1088 | 947 | 1134 | 1135 |
| HUS | 68 | 64 | 65 | 115 | 81 |

2.4.4 Veterinärmedizinische Bedeutung der Shiga Toxin-bildenden *E. coli*

2.4.4.1 Lebensmittelhygienische Sicht

Der erste Nachweis von EHEC, und zwar des Stammes O157:H7, gelang während eines Ausbruchs von hämorrhagischer Colitis 1982 in den USA und wenig später in Kanada (CDC, 1983, Karch et al., 2000). Dieser Ausbruch war auf den Verzehr von nicht ausreichend erhitzten Hamburgern zurückzuführen; in Deutschland wurden die ersten Erkrankungen 1985 registriert. Nach heutigem Wissensstand gelten folgende Übertragungswege als gesichert (RKI, 2001):

- kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser, sowie Baden in kontaminierten Gewässern
- Kontaktinfektionen von Mensch zu Mensch
- Tierkontakt

Als Hauptreservoir hat man Wiederkäuer, insbesondere Rinder, aber auch Schafe und Ziegen, identifiziert, die als symptomlose Ausscheider von STEC gelten (Bülte et al., 1990, Beutin et al., 1993, Baljer und Wieler, 1999). Eine Studie zu dem Vorkommen von STEC im Kot von Schlachtrindern ergab 1997 eine Nachweisrate von 47,6 % (Richter et al., 1997). Einzelkotuntersuchungen bei klinisch gesunden Rindern in Deutschland, durchgeführt durch die zuständigen Behörden der einzelnen Bundesländer, ergaben 2002 eine Nachweisrate für STEC von 12,24 %, bei Milchrindern von 9,5 % (Hartung, 2003). Da diesen Untersuchungen allerdings relativ geringe Tierzahlen zugrunde liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die Durchseuchungsrate in einzelnen Beständen auch erheblich höher, teilweise sogar bis 100 %, liegt (Bülte, 2004). Eine Langzeituntersuchung der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten in vier deutschen landwirtschaftlichen Betrieben ergab eine STEC-Nachweisrate von 29 - 82 % bei den beprobten Tieren (Geue et al., 2002); die dort gewonnenen Isolate besaßen alle das genetische Potential typischer EHEC-Stämme, so dass ein Gefährdungspotential für den Menschen gegeben ist (Geue et al., 2004).

Auch bei anderen gesunden Haustieren (u. a. Katzen und Hunden) konnten STEC im Kot nachgewiesen werden. Eine Gefährdung des Menschen ist somit auch bei diesen Tierarten nicht auszuschließen (Beutin et al., 1993, Gallien et al., 1994, Stöcker, 2002). Bei Pferden gelang nach einer Studie von Goll und Bülte in 61 % der untersuchten Kotproben der Nachweis von *E. coli* O157-Stämmen, die allerdings weder ein Shiga Toxin- noch ein *eae*-Gen trugen. So ist davon auszugehen, dass Pferde kein Reservoir für STEC darstellen (Goll und Bülte, 2004).

Neben den Haustieren muss man aber auch Wildtiere, insbesondere Wildwiederkäuer, zu den STEC-Reservoirs zählen (Lehmann et al., 2003). Auch über O157:H7-Ausbrüche nach Verzehr von Hirschfleisch wurde bereits berichtet (Keene et al., 1997, Rabatsky-Ehr et al., 2002).

Da die durch EHEC produzierten Shiga Toxine nicht hitzestabil sind, lassen sich lebensmittelbedingte Ausbrüche am besten dadurch verhindern, dass Speisen vor Verzehr ausreichend erhitzt werden. Das empfiehlt sich vor allem bei Risikogruppen, also Kindern bis 6 Jahren und älteren Menschen. Durch die Änderung der Milchverordnung (MilchV) vom 3. Dezember 1997 ist inzwischen auch das Verbot, unpasteurisierte Milch, einschließlich Vorzugsmilch, in Gemeinschaftseinrichtungen abzugeben, gesetzlich verankert. Des Weiteren versucht man, ebenfalls durch gesetzliche Vorschriften (§ 8, MilchV), Rohmilchkonsum aufgrund von Direktvermarktung durch entsprechende Warnhinweise in den Abgabestellen zu verhindern. Eine der wenigen Ausnahmen bilden hier die Alm- und Alpbetriebe, für die gemäß § 8, Absatz 2, MilchV gesonderte Regelungen gelten, sofern eine Abgabe von Rohmilch nur an Wanderer und Almhütten erfolgt. Darin ist allerdings eine potentielle Gefährdung des Verbrauchers durch eine EHEC-Infektion zu sehen.

Tabelle 2: O157:H7-Ausbrüche und vermutete Kontaminationsquellen (CDC, 1997, WHO, 2000, CDC, 2003)

| Ort | Kontaminationsquelle | Anzahl der Betroffenen (Todesfälle) | Zeit |
|----------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------|
| Ottawa, Kanada | Vermutlich unzureichend erhitzte Hamburger | 31 (1) | 01.11.1982 |
| Burdine Township, USA | Lokale Trinkwasserversorgung | 243 (4) | Dezember 1989 bis Januar 1990 |
| Südafrika und Swasiland | Lokale Trinkwasserversorgung | mehrere 1000 (unbekannt) | Oktober 1992 |
| Westen der USA | Unpasteurisierter Apfelsaft | 66 (1) | Oktober 1996 |
| Winnipeg, Kanada | Unzureichend erhitzte Hamburger | 7 (0) | Mai 1999 |
| Walkerton, Ontario, Kanada | Lokale Trinkwasserversorgung | 2000 (7) | Sommer 2000 |

2.4.4.2 Bedeutung der Shiga Toxin-bildenden *E. coli* bei Nutztieren

Man geht davon aus, dass STEC bei erwachsenen Rindern zur normalen Darmflora zu zählen sind; Erkrankungsfälle werden bei Kälbern beschrieben (Baljer et al., 1990). Das Erregerspektrum der neonatalen Kälberdiarrhoe umfasst vor allem verschiedene ETEC-Stämme (Selbitz, 2002). In Infektionsversuchen konnten amerikanische Forscher allerdings nachweisen, dass *E. coli* O157:H7 bei Kälbern wässrig-blutige Diarrhoe hervorrufen kann; auch Todesfälle wurden beschrieben (Dean-Nystrom et al., 1998). Neben der neonatalen Kälberdiarrhoe sind *E. coli* auch für Jungtierseptikämien bei Rindern und Schafen verantwortlich. Hier steht das Serovar O78:K80 im Vordergrund, es werden aber auch „bestandsspezifische“ Stämme isoliert (Selbitz, 2002). STEC-Stämme scheinen bei dieser Erkrankung allerdings keine Rolle zu spielen. Des Weiteren werden bei erwachsenen Tieren Colimastitiden beobachtet; allerdings ist es nicht möglich, bestimmte *E. coli*-Stämme als eutervirulent zu charakterisieren. Es ist somit nicht auszuschließen, dass bei einem solchen Geschehen auch STEC beteiligt sind, vor allem, da eine Euterinfektion häufig durch Bakterien aus der Umgebung verursacht wird (Selbitz, 2002). Bei Ferkeln werden, ähnlich wie bei Kälbern, ETEC-Stämme als Erreger der Coliruhr der Saugferkel und der Colidiarrhoe der Absatzferkel (postweaning diarrhoe) diagnostiziert. STEC dagegen sind für die Colienterotoxämie (Ödemkrankheit) vornehmlich in den ersten zwei Wochen nach dem Absetzen verantwortlich. Der Shiga Toxin-Subtyp *stx2e* wird am häufigsten bei diesen Erregern isoliert. Er führt aufgrund von Gefäßschädigung zur Ödembildung, zur Schädigung des Nervengewebes und schließlich zur Encephalomalacie. Die STEC-Stämme, die für die Ödemkrankheit verantwortlich sind, zählen allerdings nach heutigen Erkenntnissen nicht zu den Zoonoseerregern (Appel et al., 1989, Bülte et al., 1990, Europäische Kommission, 2000, Selbitz, 2002, Bauernfeind et al., 2004).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die ETEC- und STEC-Stämme, die bei Tieren ernstzunehmende Erkrankungen hervorrufen, bei humanen Erkrankungsfällen keine Rolle spielen.

2.4.4.3 Maßnahmen im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens

Seit Jahren wird mit Unterstützung der WHO intensiv an humanen Impfstoffen gegen ETEC und EHEC geforscht. Eine in Schweden entwickelte Schluckvaccine gegen ETEC ging 1999 in die klinische Prüfung ebenso wie eine Lebendvaccine des Center of Vaccine Development of the University of Maryland (USA). Beide werden an größeren Populationen getestet - an Kindern und Jugendlichen in Entwicklungsländern und an Reisenden aus Industrienationen in Entwicklungsländern (WHO, 1999). Japanische Forscherteams haben einen attenuierten Lebendimpfstoff und eine Stx-Subunit-Vaccine hergestellt, weitere Entwicklungen sind abzuwarten (WHO, 1999). Ob diese Impfstoffe in absehbarer Zeit auf den Markt kommen und ob sie sich nach einer genauen Kosten-Nutzen-Abwägung durchsetzen werden, bleibt abzuwarten. Da sich aber eine Infektion mit EHEC oder ETEC auch bei größtmöglicher Hygiene sowohl im Lebensmittel- wie auch im Tierbereich nicht ausschließen lässt, stellt eine Schutzimpfung gerade auch für Risikogruppen eine überlegenswerte Investition dar.

Auf dem veterinärmedizinischen Sektor hat die Vaccine and Infectious Disease Organization der University of Saskatchewan (Kanada) in Zusammenarbeit mit zwei kanadischen Pharmaunternehmen eine Vaccine gegen *E. coli* O:157 entwickelt, die unter experimentellen Bedingungen eine Reduktion der Ausscheidung um 95 % bewirkt. Tests unter Feldbedingungen erbrachten immerhin eine Reduktion um 59 % im Vergleich zu ungeimpften Tieren. Sollten sich die Ergebnisse weiterhin so positiv entwickeln, kann man mit einer Einführung der Vaccine auf dem nordamerikanischen Markt in ein bis zwei Jahren rechnen. Es soll nun des Weiteren getestet werden, ob der Impfstoff auch für andere *E. coli*-Stämme eingesetzt werden kann (Laidwell, 2004).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt der nächsten Jahre wird auf der genaueren Identifizierung der Pathogenitätsfaktoren liegen. Zum einen ergibt sich das Problem, dass inzwischen eine Gruppe sog. Shiga Toxin-Nonsecretors entdeckt wurde, die zwar das Gen für *stx1* und/oder *stx2* trägt, aber nicht in der Lage ist, dieses Toxin zu exprimieren (Zhang et al., 2004). Eine solche Diskrepanz zwischen Genotyp und Phänotyp stellt gerade bei einer PCR-basierenden Diagnostik und einer anschließenden lebensmittelrechtlichen Beurteilung ein Problem dar.

Ebenso versucht man auf dem humanmedizinischen Sektor, eine routinemäßige *stx*-Feintypisierung als prognostischen Marker zu etablieren, da mittlerweile klar ist, dass Isolate mit *stx1* überwiegend Enteritis, Isolate mit *stx2* in Kombination mit *eae* häufiger HUS verursachen (Roggentin, 2004).

2.5 Thermophile *Campylobacter* species

2.5.1 Mikrobiologische Eigenschaften der thermophilen *Campylobacter* species

Zur Gattung der *Campylobacter* zählen gramnegative, schlanke, nicht-sporenbildende, monotrich begeißelte, schraubig gedrehte Stäbchen, die charakteristische korkenzieherartige Bewegungen ausführen. Sie wachsen unter mikroaeroben oder anaeroben Bedingungen, je nach Spezies, bei unterschiedlichen Temperaturoptima. Die thermophilen *Campylobacter* spp., zu denen *Campylobacter jejuni*, *coli*, *lari* und *upsaliensis* zählen, haben ihr Wachstumsoptimum bei 42° C, *Campylobacter fetus fetus* dagegen bei 25° C. Für die Anzucht stehen unterschiedliche flüssige oder feste Selektivnährmedien zur Verfügung (Elmer-Englhard et al., 1998, Selbitz, 2002, Donnison, 2003). Als flüssiges Anreicherungsmedium wird im Lebensmittelbereich häufig Preston-Bouillon eingesetzt. Diese enthält neben lysiertem Pferdeblut auch vier antibiotische Supplemente: Polymyxin B (5 IU/ml), Rifampicin (10 µg/ml), Trimethoprim (10 µg/ml) und Amphotericin B (100 µg/ml) (Donnison, 2003). Die Antibiotikazusätze sollen die Vermehrung der Begleitflora, die in Lebensmitteln, insbesondere aber auch in Kotproben immer vorhanden ist, hemmen und so eine optimale Anreicherung der *Campylobacter* spp. ermöglichen. Gegenwärtig ist allerdings auf nationaler und internationaler Ebene ein neuer Entwurf für ein kulturelles Nachweisverfahren von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln (DIN EN ISO 10272-1:2004) in Diskussion, in dem die bisher üblicherweise verwendete Preston-Bouillon durch ein anderes Selektivnährmedium (Bolton-Bouillon) ersetzt werden soll (Bartelt, 2004). Zur Anzucht auf festen Nährmedien kann neben normalem Blutagar bei einer starken Verunreinigung der Probe auch auf Selektivnährböden zurückgegriffen werden. Geeignet ist hier zum Beispiel Skirrow-Agar, der, ebenso wie die Preston-Nährbouillon, antibiotische Zusätze enthält.

Tabelle 3: Eigenschaften der wichtigsten *Campylobacter* spp. (nach N.N., 1996 und Bridson, 1995)

| Spezies | Biochemische Reaktionen | | | | | Wachstumstemperatur | | |
|----------------------------|-------------------------|--------|------------------|----------|--------|---------------------|---------|---------|
| | Katalase | Nitrat | H ₂ S | Hippurat | Urease | + 25° C | + 37° C | + 42° C |
| <i>C. fetus fetus</i> | + | + | – | – | – | + | + | –/+ |
| <i>C. fetus venerealis</i> | + | + | – | – | – | + | + | + |
| <i>C. hyointestinalis</i> | + | + | + | – | – | +/– | + | + |
| <i>C. jejuni</i> | + | + | – | + | – | – | + | + |
| <i>C. coli</i> | + | + | – | – | – | – | + | + |
| <i>C. lari</i> | + | + | – | – | – | – | + | + |
| <i>C. upsaliensis</i> | + | + | – | – | – | – | + | + |
| <i>C. mucosalis</i> | – | + | + | – | – | – | + | + |
| <i>C. sputorum</i> | | | | | | | | |
| - <i>biov. sputorum</i> | – | + | +/– | – | – | – | + | + |
| - <i>biov. bubulus</i> | – | + | + | – | – | – | + | + |
| - <i>biov. fecalis</i> | + | + | + | – | – | – | + | + |

Die blaue Schrift kennzeichnet die als bakterielle Enteritiserreger beim Menschen bekannten Spezies

2.5.2 Pathogenitätsfaktoren und Übertragungswege

Die Sequenzierung des *Campylobacter-jejuni*-NCTC-11168-Genoms durch Parkhill et al. (2000) brachte einige Fortschritte für das Verständnis der Pathogenitätsfaktoren dieser Erregergruppe. Obwohl das Genom nach den vorliegenden Erkenntnissen keine „klassischen Virulenzfaktoren“ wie zum Beispiel ein Cholera-like-Toxin-Gen oder Gene für Adhäsine und Invasine aufweist, ist davon auszugehen, dass die Pathogenität auf die Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion sowie zur Toxinbildung zurückzuführen ist (Kist, 2002). Ein Toxin, dessen Gen identifiziert werden konnte, ist das Cytholethal-Distending-Toxin (CDT), das durch das *cdtA-C*-Gen codiert wird (Parkhill et al., 2000). Das CDT stellt einen Komplex aus drei Untereinheiten dar und entfaltet seine toxische Wirkung durch die Blockade des Zellzyklus in der G2-Phase (Kist, 2002). Dennoch sollten die Ergebnisse dieser Sequenzierung nur unter Vorsicht ausgewertet werden,

da *Campylobacter* spp. für ihre Variabilität bekannt sind und anders als beispielsweise bei *Salmonella* spp. oder *E. coli* die Genome einzelner Stämme sehr verschieden sein können (Wassenaar, 2004).

Neben Motilitäts- und Adhärenzfaktoren besitzen die *Campylobacter* spp. Temperaturregulations- und Hitzeschockproteine, die es ihnen ermöglichen, sich an wechselnde Umgebungstemperaturen anzupassen, z. B. im Geflügeldarm + 42° C, im Menschen + 37° C und in der Umwelt unter + 20° C (Kist, 2002).

Ähnlich wie für EHEC können auch für thermophile *Campylobacter* spp. heute drei Übertragungswege als gesichert gelten (WHO, 2000):

- kontaminierte Lebensmittel, insbesondere rohes oder unzureichend erhitztes Fleisch und Fleischprodukte sowie Rohmilch und Rohmilchprodukte, und kontaminiertes Trinkwasser
- Kontaktinfektion von Mensch zu Mensch
- Tierkontakt

Neben Wiederkäuern können auch Schweine und Geflügel thermophile *Campylobacter* spp. beherbergen und somit als Vehikel für menschliche Erkrankungsfälle dienen (Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 1999).

Für *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen besteht seit 2001 gemäß IfSG eine bundesweite Meldepflicht, wobei auch hier mit einer Dunkelziffer nicht diagnostizierter Infektionen gerechnet werden muss. Nach den statistischen Angaben des RKI wurden 2003 in Deutschland 47.876 Erkrankungsfälle gemeldet. Damit zählen die thermophilen *Campylobacter* spp. nach den Salmonellen zu den häufigsten meldepflichtigen Enteritiserregern (RKI, 2004).

Tabelle 4: Surveillance-Daten des RKI für die wichtigsten bakteriellen Gastroenteritiden (RKI, 2000 u. 2003) nach Bundesseuchengesetz (bis 2000) und Infektionsschutzgesetz (ab 2001):

| Erkrankung | Erkrankte Personen | | | | |
|-------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 |
| Salmonellose | 85146 | 79535 | 77084 | 2379 | 63044 |
| Campylobacteriose | 28882 | 30876 | 54470 | 56372 | 47876 |
| Yersiniose | 5321 | 4778 | 7191 | 7525 | 6571 |
| EHEC (ohne HUS) | 2848 | 3052 | 947 | 1134 | 1135 |

blaue Schrift: *E. coli* (keine Differenzierung zwischen *E. coli* und EHEC, da im Bundesseuchengesetz keine Meldepflicht für EHEC)

2.5.3 Postinfektiöse Syndrome nach einer Campylobacteriose

Eine menschliche Campylobacteriose zeigt sich üblicherweise als akute Enteritis, die im Allgemeinen eine Woche lang anhält. Daraus können sich allerdings auch eine hämorrhagische Colitis und in seltenen Fällen postinfektiöse Syndrome entwickeln. Man geht davon aus, dass etwa 30 % bis 40 % der Erkrankungen am Guillain-Barré-Syndrom auf eine vorhergehende Campylobacteriose zurückzuführen sind. Nach amerikanischen Studien zieht etwa jede 1050. *Campylobacter jejuni* Infektion ein Guillain-Barré-Syndrom nach sich (Nachamkin et al., 1998). Es handelt es sich dabei um eine Autoimmunerkrankung des peripheren Nervensystems, die durch eine symmetrisch aufsteigende Paralyse, häufig gepaart mit sensorischen Ausfällen, gekennzeichnet ist. In ca. 20 % der Fälle entwickeln die Patienten eine respiratorische Insuffizienz, die eine künstliche Beatmung nach sich zieht (Stein, 2004, Schmitt-Ott, 2004). Todesfälle sind allerdings inzwischen selten geworden. Der Erkrankungskomplex des Guillain-Barré-Syndroms kann in vier charakteristische Erkrankungsverläufe unterteilt werden (Kist, 2002):

- die akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie, gekennzeichnet durch Areflexie und distal oder proximal betonte Paralysen
- die akute motorische axonale Neuropathie, gekennzeichnet durch ausschließlich motorische Ausfälle
- die akute motorische und sensorische axonale Neuropathie, bei der im Vergleich zur akuten motorischen axonalen Neuropathie zusätzlich eine sensible Beteiligung beobachtet werden kann

- das Miller-Fisher-Syndrom mit den drei Kardinalsymptomen:
 - Ophthalmoplegie
 - zerebelläre Ataxie
 - Areflexie

Dabei ist nach heutigen Erkenntnissen das Risiko, an einem dieser postinfektiösen Syndrome zu erkranken, bei bestimmten *Campylobacter jejuni* Serotypen höher. Bei Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom wurde häufiger O:19, bei Patienten mit Miller-Fisher-Syndrom O:2 isoliert (Yuki et al., 1997, Nachamkin et al., 1998).

Des Weiteren findet man bei ca. 2 - 3 % der Patienten innerhalb eines Monats nach einer *Campylobacter*-Infektion eine reaktive Arthritis, seltener das sogenannte Reiter's Syndrom. Dieses durch den deutschen Bakteriologen Hans Reiter (1881-1969) zum ersten Mal beschriebene Syndrom zählt zu den reaktiven Arthritiden, bei denen eine genetische Prädisposition angenommen wird, da bei über 80 % der Patienten das HLA-B27-Gen als Genvariante festgestellt werden konnte. Neben den eigentlichen arthritischen Erscheinungen sind eine Konjunktivitis und Entzündungen der Genitalien, des Harnbereichs und des Magen-Darm-Traktes zu beobachten (Keat and Rowe, 1997, Kist, 2002).

2.5.4 Veterinärmedizinische Aspekte thermophiler *Campylobacter* species

2.5.4.1 Lebensmittelhygienische Sichtweise

Für *Campylobacter* spp. gilt, ebenso wie für EHEC, dass sie nicht thermostabil sind und somit bei einer ausreichenden Erhitzung von Lebensmitteln abgetötet werden. Deshalb stellt natürlich die Abgabe von Rohmilch und Rohmilchkäse eine potentielle Gefahr dar; allerdings geht man davon aus, dass thermophile *Campylobacter* spp. in Milch und Milchprodukten nur begrenzt überdauern können (Stiller, 1998), so dass das Erkrankungsrisiko geringer als bei EHEC sein dürfte.

2.5.4.2 Thermophile *Campylobacter* species bei Nutztieren

Thermophile *Campylobacter* spp. spielen als Krankheitserreger bei Nutztieren nur eine untergeordnete Rolle. Die meisten Nutztiere, vor allem aber das Geflügel, sind

symptomlose Träger dieses Erregers (Glünder et al., 2004); bei Hühnern wird *Campylobacter jejuni* gelegentlich beim Auftreten von Hepatitiden isoliert und bei Rindern wird eine Beteiligung von *Campylobacter jejuni* an der sogenannten Winterdysenterie diskutiert. Als Mastitiserreger tritt er dagegen nur in sehr seltenen Fällen in Erscheinung. *Campylobacter fetus* spp. *venerealis* dagegen, der bei Rindern als Aborterreger zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen zählt, hat beim Menschen bis jetzt keine wissenschaftlich belegbare Bedeutung (Selbitz, 2002)

2.5.4.3 Maßnahmen im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens

Die Veterinary Infectious Disease Organization der Universität von Saskatchewan, Kanada, arbeitet zur Zeit an einem Impfstoff, der die Kolonisation von *Campylobacter jejuni* verhindern oder zumindest stark reduzieren soll. Ein solcher Impfstoff könnte die Gefahr, die vor allem von kontaminiertem Geflügelfleisch ausgeht, deutlich verringern (Bond, 2003).

Bereits 1999 hat eine amerikanisch-kanadische Forschergruppe einen Bericht über eine rekombinante Flagellin-Subunit-Vaccine veröffentlicht, die im Mausmodell nach Immunisierung und anschließender intranasaler Infektion mit *Campylobacter jejuni* eine Schutzwirkung von 81 % gegen eine Erkrankung und 84 % gegen eine Kolonisation des Erregers zeigte (Lee et al., 1999). Weiterführende Untersuchungen sind hier geplant.

Eine humane Vaccine gegen thermophile *Campylobacter* spp. wird wohl in absehbarer Zeit nicht auf den Markt kommen, da noch nicht im Detail geklärt ist, welche Rolle das Immunsystem bei der Entstehung des Guillain-Barré-Syndroms spielt. Die Lipooligosaccharide, die sich in der äußeren Membran von *Campylobacter jejuni* befinden, zeigen eine auffällige strukturelle Ähnlichkeit zu den sialinisierten Gangliosiden tierischer Nervenzellen, so dass ein wesentlicher Faktor der Pathogenese dieser Erkrankung die Antikörperbildung gegen die Lipooligosaccharide thermophiler *Campylobacter* spp. und damit auch gegen die körpereigenen Ganglioside sein dürfte. So könnte bei der Verabreichung eines Impfstoffes die Gefahr bestehen, über die Immunreaktion ein Guillain-Barré-Syndrom auszulösen. Allerdings gehen die Forschungen auch auf diesem Sektor weiter (Kist, 2002).

Ein weiteres zukünftiges Problem stellt die zunehmende Resistenzentwicklung der thermophilen *Campylobacter* spp. dar. Zu diesem Thema hat das Bundesinstitut für Risikobewertung umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um eine Status-quo-Feststellung treffen zu können (Bartelt und Luber, 2004). Ein europäisches Überwachungs- und Interventionsprogramm wäre hier dringend notwendig und soll demnächst auf Basis der Zoonose-Richtlinie 2003/99/EG installiert werden (Schneider, 2004).

3 MATERIAL UND METHODEN

Um den Status quo in den teilnehmenden landwirtschaftlichen Betrieben festlegen zu können, wurde der erste Probendurchlauf bereits vor der Almsaison von Februar bis Mai 2004 durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen erfolgte eine Entnahme von Rinderkot-, Milch- und Wasserproben im Stall sowie in einem Betrieb auch von humanen Stuhlproben. Das gesamte Probengut wurde auf STEC und thermophile *Campylobacter* spp. untersucht, die Untersuchung der humanen Stuhlproben auf *Campylobacter* spp. allerdings vom humanmedizinischen Labor des LGL, Oberschleißheim, übernommen.

Die Rinderkotproben wurden überwiegend rektal entnommen; deshalb wurde bei Tieren, die während der ersten Probenentnahme kurz vor der Abkalbung standen oder frisch besamt waren, auf eine Entnahme verzichtet. Zur Abgabe von Stuhlproben konnten nur ein Landwirt und seine Familie motiviert werden. Die Gewinnung von Einzelgemelksproben erfolgte nach einer Grobreinigung des Euters mit einem trockenen Tuch. Auf eine Desinfektion der Zitzen, wie es als Good Veterinary Practice (GVP) bei der Entnahme von Mastitisproben üblich ist, wurde gezielt verzichtet, um den üblichen Melkakt möglichst praxisgetreu nachzuempfinden. Proben der Wasserversorgung wurden ohne vorheriges Abflammen der Entnahmestellen, wie gemäß DIN vorgeschrieben, entnommen, weil diese Maßnahme bei den meisten Entnahmestellen (gefasste Quellen, Bergbäche) nicht realisierbar war.

Die zweite und dritte Probenentnahme fand dann während der Älpung der Tiere im Zeitraum von Anfang Juli bis Mitte September 2004 statt. Zusätzlich zu den oben genannten Proben konnten aber in diesem Zeitraum auch Butter und Rohmilchkäse untersucht werden.

Alle für Probennahme und Untersuchung verwendeten Materialien sind im Anhang (8.1) aufgeführt.

Tabelle 5: Anzahl und Art der entnommenen Proben (Untersuchung auf STEC/EHEC und thermophile *Campylobacter* spp.)

| Zeitraum | Rinderkot | Einzelgemelke | Tankmilch | Lebensmittel | Stuhl | Wasserversorgung |
|--------------------|-----------|---------------|-----------|------------------------|-------|------------------|
| 02/04 bis 05/04 | 79 | 59 | 2 | n. u. | 7 | 7 |
| 07/04 bis 08/04 | 75 | 76 | n. u. | Butter (1) Käse (5) | n. u. | 12 |
| 08/04 bis 09/04 | 71 | 72 | n. u. | Käse (4) | n. u. | 8 |

n. u. : nicht untersucht

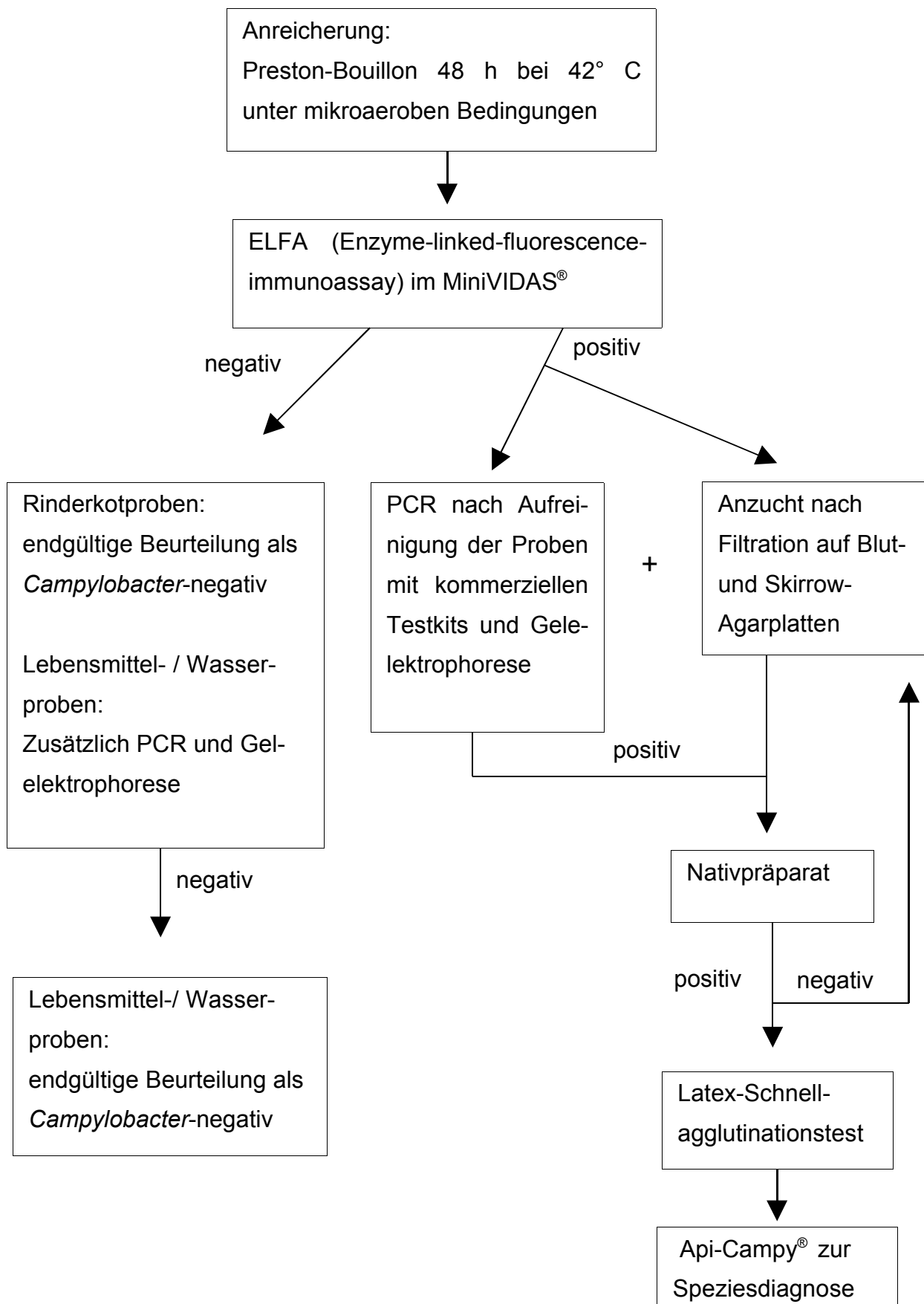
3.1 Thermophile *Campylobacter* species

Der gesamte Untersuchungsablauf für thermophile *Campylobacter* spp. ist in Abbildung 5 dargestellt. Dabei sind folgende matrixabhängige Differenzierungen zu beachten.

3.1.1 Untersuchungsmethoden für Rohmilch und andere Lebensmittel

Da thermophile *Campylobacter* spp. in Rohmilch sehr instabil und nach längstens zwei Stunden nur noch schwer nachweisbar sind, wurden die entnommenen Milchproben bereits im Stall in Preston-Nährmedium verbracht (je 10 ml Rohmilch auf 20 ml Preston-Bouillon). Die Proben wurden jeweils noch am selben Tag nach Rückkehr ins Labor in 70 ml Preston-Bouillon überführt (Endmischungsverhältnis 1 : 10) und 48 Stunden bei 42° C im CO₂-Brutschrank unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet. Durch die hohe Temperatur bei 42° C wird gewährleistet, dass sich nur die in der Rohmilch eventuell vorhandenen thermophilen *Campylobacter* spp. vermehren, nicht aber andere, auch beim Rind vorhandene *Campylobacter* spp., wie z. B. *Campylobacter fetus fetus*, die keine lebensmittelhygienische Bedeutung haben.

Lebensmittel wurden über Nacht bei 4° C gelagert, erst am Tag nach der Probenentnahme in Preston-Anreicherung verbracht (25 g Lebensmittel in 225 ml Preston-Anreicherung) und 48 Stunden bei 42° C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet.

Abbildung 5: Untersuchungsablauf thermophile *Campylobacter* spp.:

Nach 48-stündiger Bebrütung wurden ca. 5 ml der Anreicherung entnommen, bei 99° C 15 Minuten lang gekocht, durch einlagige, sterile Gaze filtriert und danach einem Screening im Mini-VIDAS® (Fa. BioMérieux) unterzogen. Das VIDAS®-Gerät arbeitet auf der Basis eines enzyme-linked fluorescence immunoassay (ELFA). *Campylobacter*-Antigen, das in der Probe enthalten ist, bindet an Anti-*Campylobacter*-Antikörper, die während der Probenbearbeitung zugeführt werden. Ungebundene Probenbestandteile werden durch Waschvorgänge entfernt. Danach werden mit Alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper zugegeben, die wiederum an jeden *Campylobacter*-Antigen-Anti-*Campylobacter*-Antikörper-Komplex binden, der sich in der Probe befindet. In einem abschließenden Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Als fluoreszierendes Substrat wird 4-methyl-umbelliferyl-Phosphat verwendet. Enzyme katalysieren die Umsetzung in das fluoreszierende Produkt, 4-methyl-Umbelliferon. Das MiniVIDAS®-Gerät misst abschließend die Fluoreszenzintensität der Probe (N.N., 2002).

Sowohl bei VIDAS-positiven wie auch -negativen Proben wurden anschließend je ein Aliquot von 1000 µl aus der Anreicherung entnommen, zentrifugiert, mit 1 × PBS-Puffer gewaschen, mit Hilfe des GENESpin®-Testkits (Fa. GeneSpin) für Lebensmittelproben nach Gebrauchsanweisung aufbereitet und nach PCR in der anschließenden Gelelektrophorese untersucht. Die PCR wurde mittels eines MasterMix durchgeführt, der folgende Komponenten pro Probe enthielt:

- | | |
|--|------------|
| - HotStarTaq® Master Mix Kit | je 12,5 µl |
| - Primer 1 (pg3: 5'-GAA CTT GAA CCG ATT TG-3', c = 50 µmol/l) | je 1,25 µl |
| - Primer 2 (pg50: 5'-ATG GGA TTT CGT ATT AAC-3', c = 50 µmol/l) | je 1,25 µl |
| - H ₂ O für PCR-Zwecke | je 9,00 µl |

Pro Probe wurden 1 µl der aufbereiteten DNA und 24 µl des MasterMixes zu einem Endvolumen von 25 µl pipettiert und in die PCR eingesetzt (Temperatur-Zeit-Profil siehe Anhang 8.1.3)

Bei der Gelelektrophorese in 2 %igem Agarosegel (67 ml TBE-Puffer und 1,34 g Agarose) wurde neben zweimal 5 µl Standard (pUC 8, Fa. Fermentas) jeweils eine

MasterMix-Kontrolle und zwei Laborstämme (C1 und C96) als Positivkontrolle mitgeführt. Nach anschließender 30-minütiger Färbung in Ethidiumbromid-Lösung erfolgte die Auswertung unter UV-Licht und eine Dokumentation des Ergebnisses mittels Computer (Auswertungsprogramm siehe Anhang 8.1).

Parallel zur Bearbeitung in der PCR wurden bei VIDAS-positiven Proben 1000 µl der Anreicherung mittels eines sterilen 0.65 µm Filters (Fa. Sartorius) filtriert, anschließend auf Blutagar und einem Selektivnährboden nach Skirrow ausgestrichen und für 48 Stunden bei 42° C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet. Skirrow-Agarplatten enthalten Pepton als Nährmedium, lysiertes Pferdeblut und die oben bereits bei der Beschreibung der Preston-Bouillon erwähnten Antibiotikazusätze, um die Vermehrung anderer Mikroorganismen zu hemmen (Donnison, 2003).

Nach Beurteilung des Wachstums auf den Blut- und Skirrowplatten sowie der Bestätigung des Vorhandenseins von *Campylobacter* spp. mittels Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop konnte aufgrund der Ergebnisse eines Api-Campy® („Bunte Reihe“) eine Spezies-Diagnose gestellt werden. Zuvor wurde durch den Dryspot *Campylobacter* Test (Firma Oxoid) das Ergebnis des Nativpräparats bestätigt. Bei dem Dryspot *Campylobacter* Test handelt es sich um einen Latex-Agglutinationstest auf der Basis von Kaninchen-Antikörpern, die mit bestimmten Oberflächenantigenen von *Campylobacter* spp. reagieren. Positive Ergebnisse zeigt der Latex-Test für *Campylobacter jejuni*, *C. lari*, *C. coli* und *C. upsaliensis*; andere *Campylobacter* spp. können variable Ergebnisse liefern (N. N., 1997). An einen positiven Latex-Test schloss sich dann zuletzt der ApiCampy® an. Der Api-Campy® arbeitet mit einer Reihe chemischer Reaktionen, die eine Unterscheidung der einzelnen *Campylobacter*-Spezies erlaubten. Besonders wichtig hierbei ist der Hippurat-Hydrolyse-Test, da er eine Differenzierung der beiden wichtigsten *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* ermöglicht. Des Weiteren wird obligatorisch ein Katalase-Test durchgeführt. Die Auswertung erfolgt entweder anhand einer dem Testkit beiliegenden Liste oder mit Hilfe einer durch die Fa. BioMérieux vertriebenen Identifizierungssoftware (N. N., 2002).

3.1.2 Untersuchungsmethoden für Wasserproben

Steril entnommene Wasserproben wurden über Nacht bei 4° C gelagert und am nächsten Tag durch 0,45 µm Cellulose-Nitrat-Filter (Fa. Sartorius), die danach eben-

falls in Preston-Nährmedium verbracht (1 Filter in 90 ml Preston-Bouillon) und für 48 Stunden bei 42° C in mikroaerobem Klima bebrütet wurden. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte analog zur Bearbeitung der Lebensmittelproben.

3.1.3 Untersuchungsmethoden für Rinderkotproben

3.1.3.1 Vorversuch zum Test der verwendeten Untersuchungsmethoden

Da im LGL, Oberschleißheim, keine routinemäßigen Untersuchungen auf thermophile *Campylobacter* spp. im Rinderkot durchgeführt werden und somit kein akkreditiertes Untersuchungsverfahren besteht, wurde in einem Vorversuch getestet, ob die bei Lebensmitteln und Milch angewandten Verfahrensweisen auf Rinderkot übertragbar sind.

Zu diesem Zwecke wurden zwei Rinderkotproben mit einer *Campylobacter*-Suspension beimpft, die jeweils eine Kolonie der Laborstämme C1 (*Campylobacter jejuni jejuni*) und C96 (*Campylobacter coli*) enthielt (Kotprobe 1 mit 1 ml Suspension, Kotprobe 2 mit 0,5 ml Suspension), und am gleichen Tag, sowie einen, zwei und drei Tage später (nach Lagerung der Proben bei 4° C) in Preston-Nährmedium verbracht, 48 Stunden bei 42° C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet und danach untersucht. Bei allen Proben waren die Ergebnisse im MiniVIDAS®-Gerät und nach Anzucht auf Blutagar im Nativpräparat positiv.

3.1.3.2 Versuchsdurchführung für Rinderkotproben

Da die Untersuchungen des Vorversuchs ergaben, dass thermophile *Campylobacter* spp. im Rinderkot wesentlich länger nachweisbar sind als in Milch, wurden die Kotproben nach Entnahme über Nacht bei 4° C gelagert und erst am nächsten Tag in Preston-Anreicherungsmedium verbracht (ca. 1 g Kot auf 10 ml Preston-Anreicherung). Eine Bebrütung der Anreicherungen fand ebenfalls für 48 Stunden bei 42° C im CO₂-Brutschrank statt. Danach wurden alle Proben einem Screening mittels MiniVIDAS® unterzogen. Bei Screening-positiven Proben wurden folgende Schritte parallel durchgeführt:

- 200 µl der Anreicherung wurden in ein PCR-Tube verbracht, mittels des QIAamp DNA Stool Mini Kit® (Fa. QIAGEN) nach Gebrauchsanweisung aufgereinigt und durch PCR und anschließende Gelelektrophorese untersucht (Inglis und Kalischuk, 2003). Für PCR und Gelelektrophorese wurden dabei die gleichen Methoden angewandt wie bei den Lebensmitteln.
- die Anreicherung wurde nach Filtration (siehe Lebensmittelproben) auf Blutagar und einen Selektivnährboden nach Skirrow ausgestrichen, 48 Stunden bei 42° C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet und danach beurteilt. Nativpräparat-positive Proben wurden einem Latex-Schnellagglutinationstest (Fa. Oxoid) unterzogen und bei hier ebenfalls positivem Ergebnis mit Hilfe des Api-Campy® einer Spezies-Diagnose unterzogen.

3.2 Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

3.2.1 Untersuchungsmethoden für Rohmilch und andere Lebensmittel

Die Untersuchung von Rohmilch und anderen Lebensmitteln erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Methode gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Diese Methode wird am LGL, Oberschleißheim, routinemäßig für alle Lebensmittelproben angewandt.

3.2.1.1 Mikrobiologische Methodik

Rohmilchproben wurden nach einer Lagerungszeit von 5 bis 7 Tagen bei – 20° C, andere Lebensmittel nach einer Lagerung von 3 bis 5 Tagen bei 4° C (Timm et al., 1998) für 5 bis 6 Stunden in modifizierte Tryptose-Soja-Bouillon (mTSB) mit Novobiocinzusatz verbracht und bei 37° C im Inkubationsschüttler mit einer Schüttelfrequenz von 180 min⁻¹ inkubiert (Amtl. Sammlung § 35 LMBG, 2002):

- Für PCR und Gelelektrophorese wurde 1 ml dieser Voranreicherung in 4 ml mTSB-Grundnährmedium ohne Novobiocinzusatz verbracht und für weitere 16 - 18 Stunden bei 37° C bebrütet. Diese Anreicherung wurde auf ENDO-Agarplatten ausgestrichen und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Die in dieser Zeit gewachsenen Keime wurden mit einem sterilen Tupfer abgenommen und

in 1500 µl physiologische, sterile NaCl-Lösung verbracht. Von dieser Suspension wurden 200 µl in 400 µl AmpuWa® überpipettiert und als PCR-Ansatz verwendet. Bei der oben genannten ENDO-Platte handelt es sich um einen Selektivnährboden zum Nachweis fäkaler *E. coli* und coliformer Keime. Er enthält Natriumsulfit und Fuchsin, die einerseits das Wachstum grampositiver Keime hemmen, andererseits die Kolonien rot färben. *E. coli* sind zusätzlich an einem metallenen Glanz (Fuchsinglanz) zu erkennen (N. N., 1996/97).

- Des Weiteren wurde von der Voranreicherung jeweils eine 1 : 10 und eine 1 : 50 Verdünnung hergestellt, im Doppelansatz auf Mueller-Hinton Nähragar ausgespatelt und für 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Anschließend erfolgte eine Beurteilung des Wachstums und eine Lagerung der Platten bei 4° C für eine evtl. nötige Keimisolierung und -differenzierung nach positivem PCR-Ergebnis. Diese Keimisolierung wurde parallel zu den eigenen Untersuchungen bei einem Teil des Probenmaterials zusätzlich vom Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabor für *E. coli* (NRL-Ec) des Bundesinstitutes für Risikoforschung in Dessau durchgeführt.

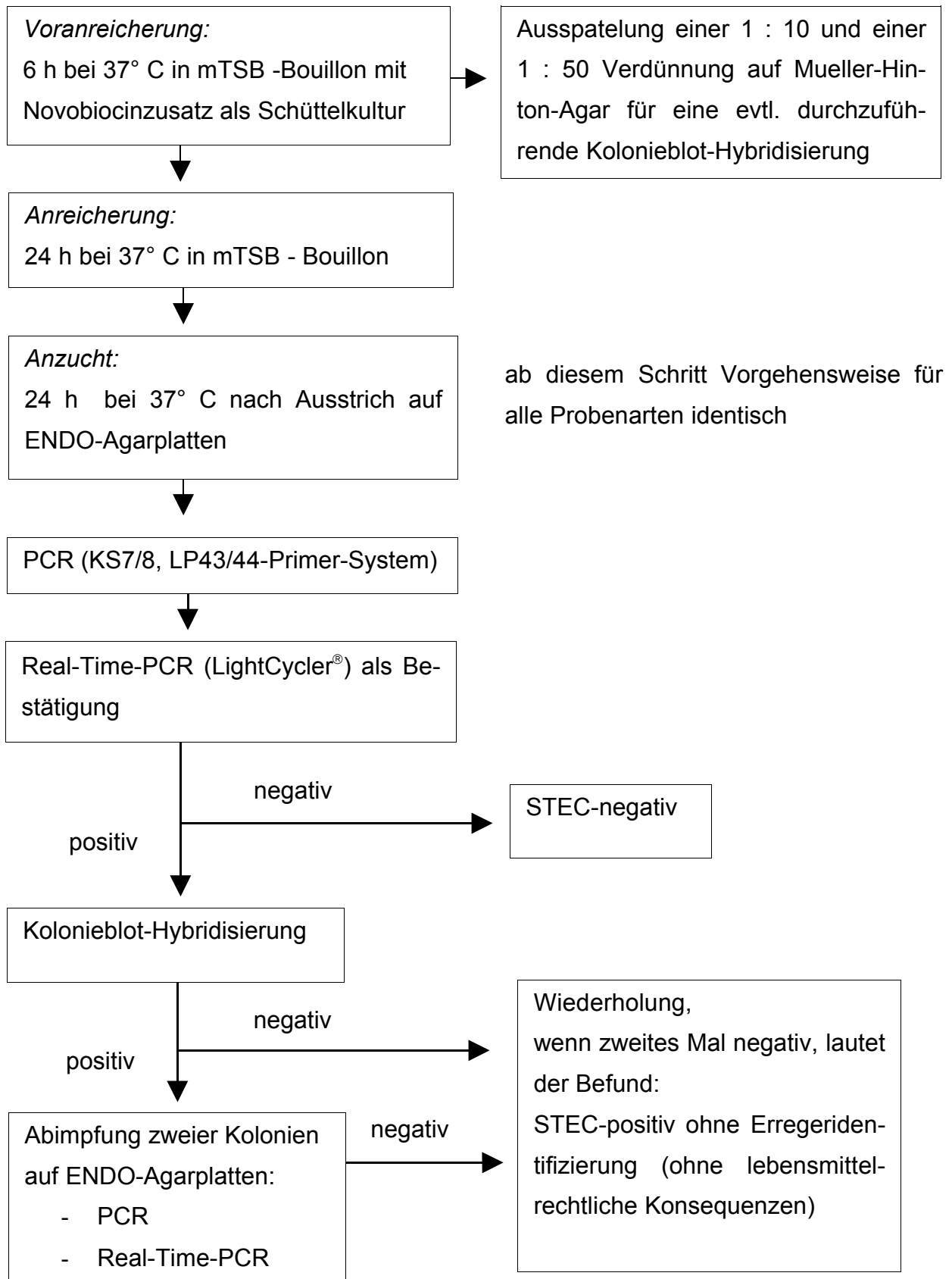
3.2.1.2 PCR

Für die Durchführung der PCR wurde der PCR-Ansatz 10 Minuten bei 95° C gekocht, anschließend 1 Minute bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Sodann wurden 8 µl des PCR-Ansatzes in 17 µl des MasterMixes überführt. Der MasterMix zur getrennten Detektion von *stx1* und *stx2* enthielt folgende Komponenten je Probe:

- | | |
|--|---------|
| - H ₂ O für PCR-Zwecke (autoklaviert) | 12,4 µl |
| - 10fache Pufferlösung mit MgCl ₂ (c = 25 mmol/l) | 2,5 µl |
| - dNTP-Mix (c = 25 mmol/l) | 0,5 µl |
| - Primer 1 (KS7 bzw. LP43, c = 50 µmol/l) | 1,0 µl |
| - Primer 2 (KS8 bzw. LP44, c = 50 µmol/l) | 1,0 µl |
| - Taq-Polymerase (c = 5 U/µl) | 0,1 µl |

Insgesamt wurden somit pro Probe jeweils 25 µl zur PCR eingesetzt und in den Thermocycler verbracht (Sequenzen der Primer und Temperatur-Zeit-Protokoll siehe Anhang 8.1.5.1)

Abbildung 6: Untersuchungsablauf STEC, Lebensmittel



Die anschließende Gelelektrophorese wurde mit 2 %igem Agarosegel unter Mitführung jeweils einer Positivkontrolle, einer Negativkontrolle (nicht toxinbildender *E. coli*-Stamm) und einer MasterMix-Kontrolle sowie des Standards (pUC 8) für *stx1* und *stx2* getrennt durchgeführt. Die Färbung des Gels erfolgte ebenfalls mit Ethidiumbromid und die Auswertung unter UV-Licht mit Hilfe eines PCs.

3.2.1.3 Real-Time-PCR

Alle Ergebnisse der genannten PCR-Methode wurden mit Hilfe einer Real-Time-PCR (LightCycler®, Firma Roche Diagnostics) überprüft. Neben den in der Publikation von Reischl et al. (2002) empfohlenen Primern und Sonden (Sequenzen siehe Anhang 8.1.5.2) wurden folgende Komponenten je Probe für den MasterMix verwendet:

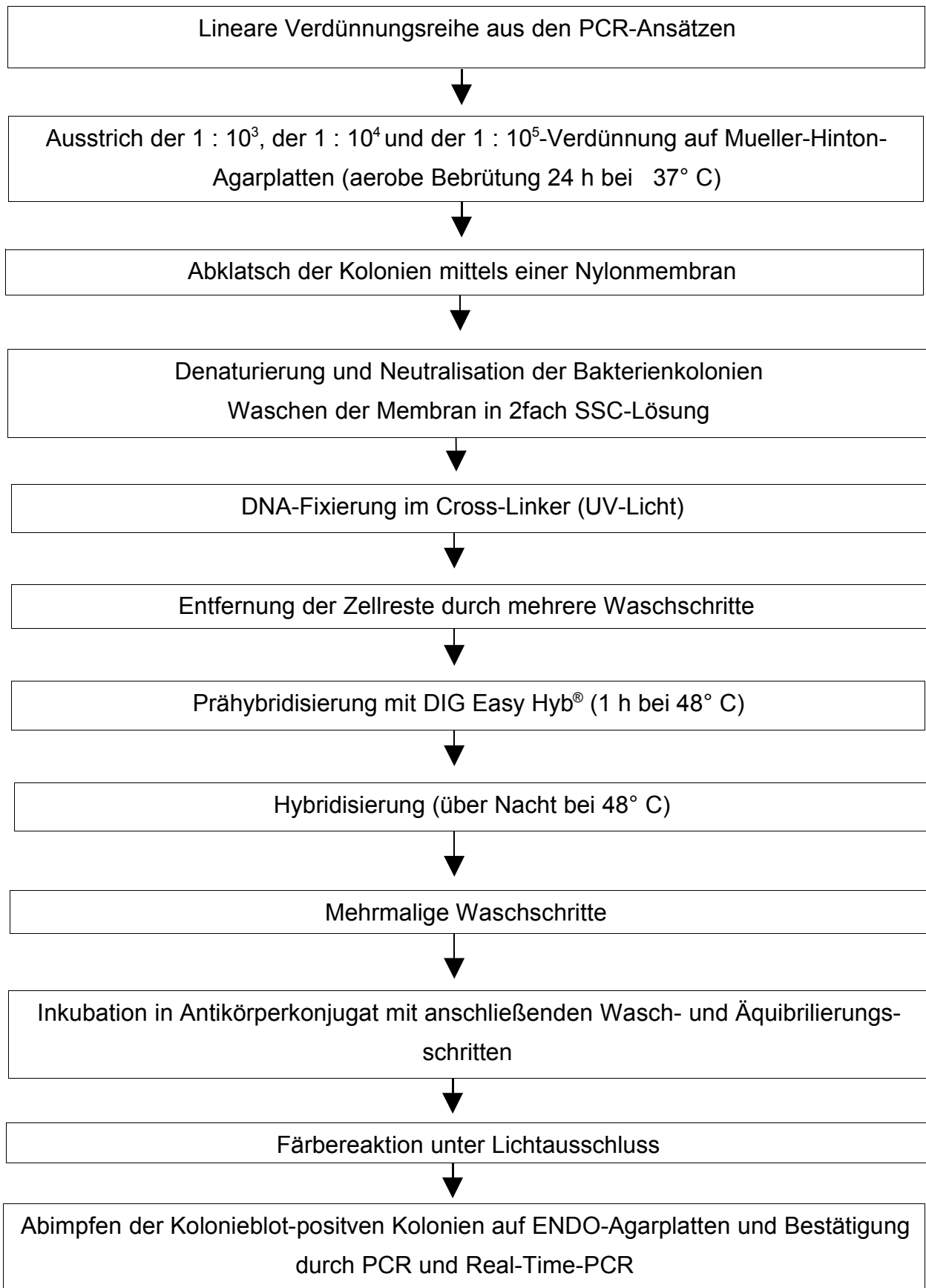
| | |
|---|--------|
| - H ₂ O zu PCR-Zwecken | 7,6 µl |
| - MgCl ₂ -Lösung (25 mmol/l) | 2,4 µl |
| - je Primer (c = 50 µmol/l) | 1,0 µl |
| - je Sonde (c = 50 µmol/l) | 1,0 µl |
| - LC-Fast Start DNA MasterMix | 2,0 µl |

8 µl des MasterMixes und 2 µl der Probe (die zuvor 15 Minuten bei 95° C gekocht und 1 Minute bei 14.000 Umdrehungen/min abzentrifugiert wurde) wurden zusammenpipettiert, nochmals zentrifugiert und in den LightCycler® verbracht (Amplifikationsprotokoll nach Reischl et al., 2002 siehe Anhang 8.1.5.2). Mittels eines angeschlossenen PCs ließen sich die Ergebnisse auswerten.

3.2.1.4 Kolonieblot–DNA–Hybridisierung

Die anschließende Keimisolierung und weitere Charakterisierung der STEC erfolgte mit Kolonie-DNA-Hybridisierung. Dazu wurden die zuvor aus der ersten Anreicherung ausgespatelten Mueller-Hinton-Platten verwendet (genaue Zusammensetzung der verwendeten Substanzen siehe Anhang 8.1)

Abbildung 7: Schema des Arbeitsablaufs der Kolonieblot-Hybridisierung (STEC-Identifizierung):



Die Nylonmembran wurde blasenfrei auf die deutlich mit Kolonien bewachsene Mueller-Hinton-Agarplatte aufgelegt, die Position des Replikafilters an der Platte markiert und der Filter wieder zügig abgezogen. Eine Positivkontrolle (Laborstamm TU1 oder TU2) wurde zusätzlich auf eine markierte Stelle der Membran aufgetragen. Zur Lyse der Bakterien kam ein mit Denaturierungslösung getränktes Gel-Blotting-Papier zum Einsatz, auf dem die Filter mit der Kolonieseite nach oben 20 Minuten verblieben. Für weitere 15 Minuten wurde die Denaturierungslösung gegen 0,2 % Triton-X100/0,5 NaOH ausgetauscht und die Filter danach für 5 Minuten auf mit Neutralisierungslösung getränktes Whatmann 3MM Papier verbracht. Zwischen jedem dieser einzelnen Schritte wurden die Filter für 5 Minuten getrocknet. An ein fünfminütiges Bad in zweifacher SSC-Lösung schloss sich ein weiterer Trocknungsschritt an, der mindestens 20 Minuten dauerte.

Zur Fixierung wurde die DNA mit der Nylonmembran im Cross-Linker mittels UV-Licht quervernetzt. Danach wurden die Filter zur Entfernung der Zellreste 20 Minuten bei 50° C in 2 × SSC, 1 % SDS, zweimal je 20 Minuten in 2 × SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal je 20 Minuten in 2 × SSC bei Raumtemperatur gewaschen.

An die einzelnen Waschschriffe schloss sich die Prähybridisierung in jeweils 20 ml DIG Easy Hyb®-Prähybridisierungslösung (Firma Roche Diagnostics) im auf 48° C vorgeheizten Hybridisierungsöfen an. Dieser Schritt zielt darauf ab, unspezifische Bindungen abzusättigen und einen optimalen pH-Wert zu schaffen. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch 2,5 ml der Hybridisierungslösung, die bereits die Sonde enthielt, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 48° C im Hybridisierungsöfen.

Am nächsten Morgen wurden die Sonden recycelt und die Filter zweimal je 5 Minuten in 2 × SSC, 0,1 % SDS und anschließend zweimal je 15 Minuten bei 60° C mit einer Lösung aus 0,5 × SSC und 0,1 × SDS gewaschen. Als Vorbereitung auf die Färbung schlossen sich nun wieder mehrere Wasch- und Inkubationsschritte an; zuerst wurden die Filter für eine Minute in den Waschpuffer verbracht, anschließend für 30 Minuten in Puffer 2 inkubiert, eine Minute in Puffer 1 gewaschen und schließlich 30 Minuten in Antikörperkonjugat bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Filter zweimal für 15 Minuten in Puffer 1 und zwei Minuten in Puffer 3 äquilibriert. Im Folgenden wurde jeder Filter einzeln in eine Petrischale verbracht, mit 10 ml Färbelösung bedeckt

und mindestens 1 Stunde in völliger Dunkelheit inkubiert. Nachdem sichtbare Banden aufgetreten waren, konnte die Färbereaktion durch Waschen mit TE-Puffer abgestoppt werden.

Durch die Kolonieblot-Hybridisierung identifizierte Kolonien wurden auf ENDO-Agarplatten abgeimpft, mittels PCR und Real-Time-PCR das Vorhandensein von *stx1* und/oder *stx2* bestätigt und ausschließlich mit Real-Time-PCR auf die Existenz des *eae*- und des *hly*-Gens untersucht. Die Vorgehensweise war in diesem Fall die gleiche, wie es oben für die Real-Time-PCR beschrieben ist (Primersequenzen und Amplifikationsprotokoll im Anhang unter 8.1). Ein Ausstrich auf Sorbitol- und Enterohämolysin-Agarplatten diente zur Feststellung der phänotypischen Merkmale der Sorbitolfermentation und der Hämolyse.

So charakterisierte Reinkulturen wurden zum Teil durch das Nationale Veterinärmedizinische Referenzlabor *E. coli* (NRL-Ec), Dessau oder aber das RKI, Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger, Wernigerode, serotypisiert. Des Weiteren wurde jedes Isolat über ein Kryobanksystem bei – 80° C konserviert.

3.2.2 Untersuchungsmethoden für Wasserproben

Wasserproben wurden nach einer maximalen Lagerungsdauer von 4 Tagen bei 4° C mittels 0,45 µm Filter (Fa. Sartorius) filtriert, die Cellulose-Nitrat-Filter auf Lactose-TTC-Nährböden verbracht und 24 Stunden bei 37° C bebrütet.

Der Lactose-TTC-Nährboden zählt zu den Selektivnährböden, die zum Nachweis von *E. coli* in Wasser mittels Membranfiltertechnik eingesetzt werden. Nach der 24-stündigen Bebrütung wurden die Nährböden mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt und die vorhandenen Keime in 1500 µl NaCl-Lösung suspendiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie für Rohmilch- und Lebensmittelproben bereits beschrieben.

3.2.3 Untersuchungsmethoden für Rinderkot- und humane Stuhlproben

Kot- und Stuhlproben wurden nach einer Lagerungsdauer von längstens 6 Tagen bei 4° C (Timm et al., 1998) auf ENDO-Agarplatten ausgestrichen und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Die gewachsenen Keime wurden von der Platte abgenommen und in 1500 µl steriler, physiologischer NaCl-Lösung suspendiert. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte wie bereits beschrieben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Status-quo-Untersuchung im Stall

Die Untersuchungen fanden zwischen Februar und Mai 2004 in vier landwirtschaftlichen Betrieben in den Landkreisen Ostallgäu, Oberallgäu und Traunstein statt. Es wurden von den zu diesem Zeitpunkt bereits laktierenden Tieren Kot- und Milch sowie in zwei Beständen auch Tankmilch- und Wasserproben entnommen. In einem Betrieb konnten zusätzlich von den Kalbinnen Kot und vom Betriebsinhaber und seiner Familie Stuhlproben gewonnen werden.

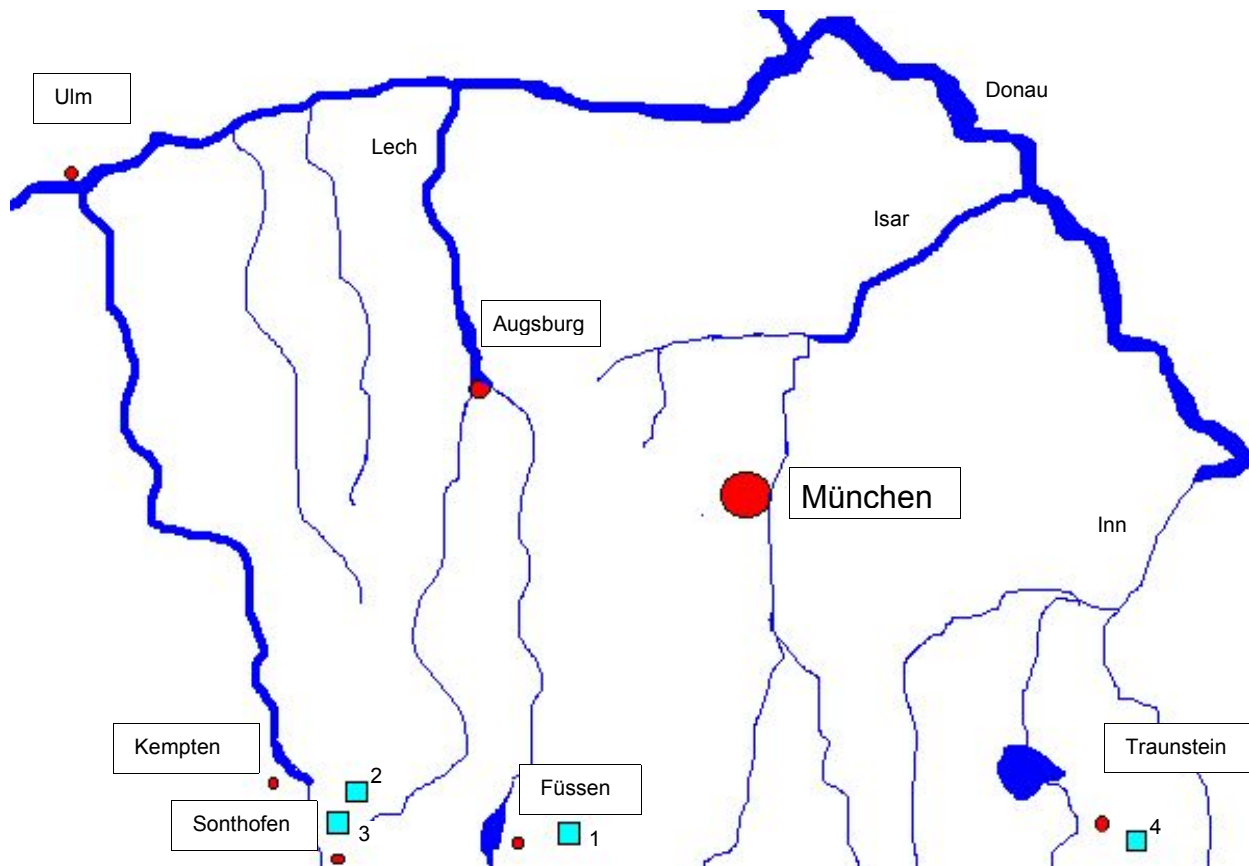
In allen vier Betrieben wird eine saisonale Abkalbung der Tiere zwischen Februar und Mai angestrebt, wobei in seltenen Fällen aufgrund zu später Belegung auch hochträchtige Kühe auf die Alm aufgetrieben werden. Deshalb war es weder im Winter noch im Sommer möglich, jeden Bestand komplett zu beproben.

Geographische Angaben beschränken sich aus Datenschutzgründen auf die einzelnen Landkreise. Eine vollständige Auflistung der Ergebnisse findet sich im Anhang (8.2).

Tabelle 6: Kurzbeschreibung der vier Betriebe (Tal):

| Betrieb | Landkreis | Bewirtschaftung | Stallart | gehaltene Rinderrasse | Anzahl der Milchkühe |
|---------|------------|------------------------|----------------|--------------------------------|----------------------|
| 1 | Ostallgäu | konventionell | Laufstall | Allgäuer Braunvieh (unbehornt) | 18 |
| 2 | Oberallgäu | konventionell | Anbindehaltung | Allgäuer Braunvieh (behornt) | 30 |
| 3 | Oberallgäu | anerkannter Biobetrieb | Laufstall | Allgäuer Braunvieh (behornt) | 21 |
| 4 | Traunstein | anerkannter Biobetrieb | Anbindehaltung | Fleckvieh, Pinzgauer (behornt) | 14 |

Abbildung 8: Skizze mit der Lage der vier beprobten Höfe:



Legende:

- 1 Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Ostallgäu
- 2 Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Oberallgäu
- 3 Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Oberallgäu
- 4 Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Traunstein

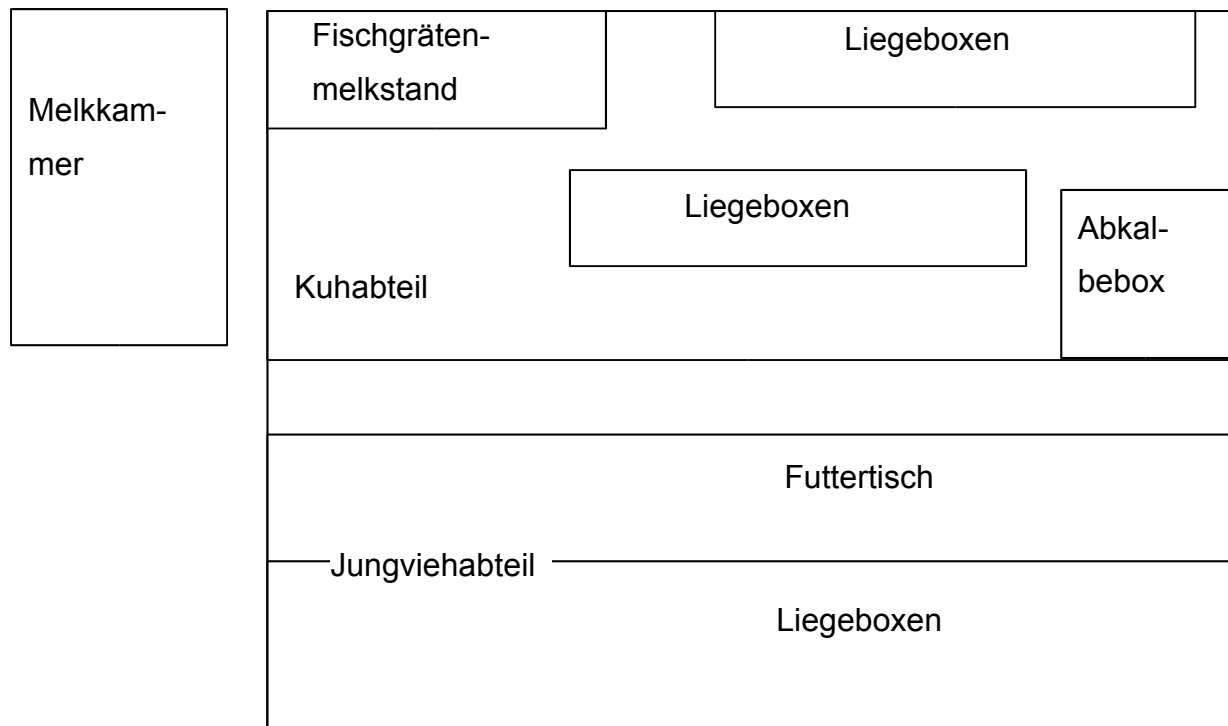
Es handelt sich bei diesen Höfen ausschließlich um hauptberufsmäßig geführte Familienbetriebe. Die beiden Biohöfe betreiben auch im Tal eine Eigenvermarktung ihrer Produkte (vor allem Almkäse, aber auch Produkte aus eigener Schlachtung). Im Tal wird die Milch von allen Betrieben an Molkereien vor Ort abgegeben. Eine Milch-ab-Hof-Abgabe erfolgt für gewöhnlich nicht.

4.1.1 Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu

Betrieb 1 ist ein konventionell wirtschaftender Betrieb mit 18 Milchkühen, davon 10 Kühen für die Alpe, und 18 Jungkühen der Rasse Allgäuer Braunvieh sowie einer Bunten Deutschen Edelziege.

Es handelt sich um einen neugebauten Laufstall mit Spaltenboden und eingestreuten Liegeboxen, in dem auf der einen Seite die Milchkühe, auf der anderen Seite die Jungkühe untergebracht sind. Im Kuhabteil ist zusätzlich ein Bereich als Abkalbebox abgetrennt. Gemolken wird in einem Fischgrätenmelkstand 2 × 5:

Abbildung 9: Stallskizze von Betrieb 1:



Milchproben zur *Campylobacter*-Untersuchung wurden ebenso wie Kot- und Wasserproben direkt vor Ort entnommen, Stuhlproben und Milchproben zur STEC-Untersuchung zwei Tage später über das Veterinäramt Marktoberdorf ans LGL, Oberschleißheim, eingesandt.

Tabelle 7: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Betrieb 1

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Stuhlproben |
|------------------------|-----------|-------------|--------------|----------------|
| STEC | 27 | 10 | 3 | 7 |
| <i>Campylobacter</i> | 27 | 10 | 3 | 7 ¹ |

¹: Untersuchung durch das humanmedizinische Labor des LGL, Oberschleißheim

Bei 15 % (4) der beprobten Tiere konnten mittels PCR thermophile *Campylobacter spp.* im Kot detektiert werden. Bei jeder dieser Proben gelang auch die Anzucht und Isolation der betreffenden Stämme, die alle mit Hilfe des Api-Campy®-Systems als *Campylobacter jejuni jejuni* identifiziert wurden. Bei den 11 Proben, die ausschließlich VIDAS-positiv, in der PCR und in der Anzucht aber negativ waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um andere, ebenfalls thermophile *Campylobacter spp.* ohne lebensmittelhygienische Bedeutung handelt.

Weder aus den Milchproben noch aus den Proben aus der Wasserversorgung wurden mittels ELFA und PCR thermophile *Campylobacter spp.* nachgewiesen.

Tabelle 8: Nachweis von thermophilen *Campylobacter spp.*, Betrieb 1

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 27 | 15 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| Milch | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Trinkwasser | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der entnommenen Proben

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Die im humanmedizinischen Labor des LGL untersuchten Stuhlproben erwiesen sich alle als *Campylobacter*-negativ.

Bei der Untersuchung auf STEC waren insgesamt Kotproben von 41 % (11) der Tiere positiv. Bei allen positiven Proben wurde eine Keimsuche mittels Kolonieblot-Hybridisierung durchgeführt (Ergebnisse siehe Anhang 8.2).

In der Milch, den Wasserproben sowie den ebenfalls untersuchten humanen Stuhlproben konnten keine STEC bzw. EHEC nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Nachweis von STEC/EHEC, Betrieb 1

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 27 | 3 | 3 | 5 | 11 |
| Milch | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Trinkwasser | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Stuhlproben | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der entnommenen Proben

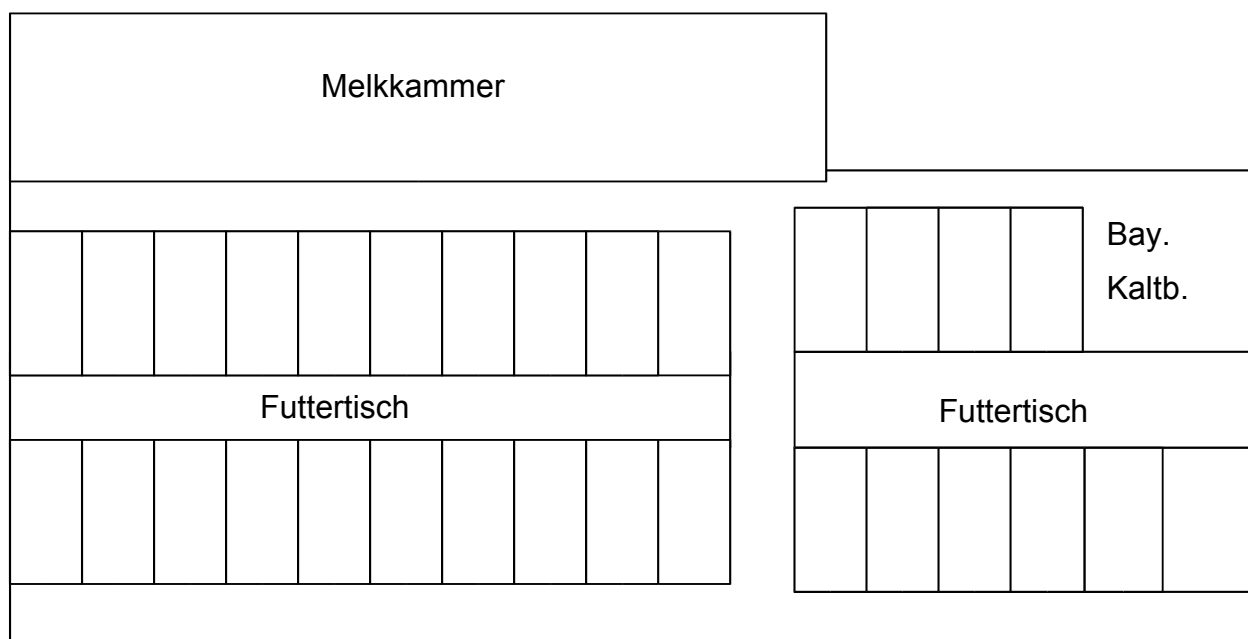
stx1, *stx2*: *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.1.2 Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu

Betrieb 2 ist eine ebenfalls konventionell wirtschaftende Braunviehhaltung mit 30 Milchkühen, 6 Jungkühen, 1 Bullen, einem Bayerischen Kaltblut und mehreren Mastschweinen.

Bei dem Stall handelt es sich um eine Anbindehaltung mit zweireihiger Aufstallung und mittlerem Futtertisch. Die Tiere werden im Kurzstand mit Kotrost und Halsrahmenanbindung gehalten. Gemolken wird am Standplatz mittels einer Rohrmelkanlage.

Abbildung 10: Skizze des Stalls von Betrieb 2



Bei diesem Betrieb, wie auch bei den weiteren Höfen (Oberallgäu und Traunstein), wurden alle Proben vor Ort entnommen und direkt ins Labor des LGL, Oberschleißheim, gebracht.

Tabelle 10: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Betrieb 2

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Stuhlproben |
|------------------------|-----------|-----------------|--------------|-------------|
| STEC | 24 | 22 ¹ | n. u. | n. u. |
| <i>Campylobacter</i> | 24 | 22 ¹ | n. u. | n. u. |

n. u. : nicht untersucht

¹: 21 Einzelgemelks- und eine Tankmilchprobe

Bei der Untersuchung auf thermophile *Campylobacter* spp. waren die Kotproben von 54 % (13) der Tiere VIDAS-positiv, 42 % (10) PCR-positiv; bei all den PCR-positiven Proben gelang auch die Anzucht der Bakterien. Die 10 isolierten Stämme konnten aufgrund der Ergebnisse des Api Campy®-Systems als *Campylobacter jejuni jejuni* identifiziert werden.

Die entnommenen Milchproben, einschließlich der Tankmilchprobe, dagegen waren *Campylobacter*-negativ.

Tabelle 11: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 2

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 24 | 13 | 10 | 10 | 0 | 0 | |
| Milch | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

n : Anzahl der entnommenen Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

STEC konnte in insgesamt 38 % der Rinderkotproben nachgewiesen werden. Die Milchproben waren allerdings, ebenso wie die Tankmilch, STEC-negativ.

Tabelle 12: Nachweis von STEC, Betrieb 2

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 24 | 3 | 4 | 2 | 9 |
| Milch | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der entnommenen Proben

tx1, stx2: *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.1.3 Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu

Dieser Milchviehbetrieb ist ein Bioland-Betrieb mit Allgäuer Braunviehhaltung im Laufstall. Es wird ausschließlich die eigene Nachzucht aufgestellt, ein Zukauf von Tieren findet nicht statt. Der Betrieb besitzt 21 Milchkühe, 10 Jungtiere, einen Jungbullen sowie einen Esel und eine Ziege. Es handelt sich um einen doppelseitigen Liegeboxenlaufstall mit erhöhtem Tiefstreu liegebereich, Spaltenboden im Fressbereich und einem absperrbaren Fressgitter. Gemolken wird in einem Fischgrätenmelkstand.

Abbildung 11: Skizze des Stalls von Betrieb 3

| | | | | |
|-----------------|----------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Melk- kammer | Melk- stand | <i>Kühe</i> | Tiefstreu (Liegebereich) | Abkalbebox |
| | | Spaltenboden (Fressbereich) | | |
| Heuboden | | <i>Esel und Ziege</i> | <i>Jungvieh</i> | Spaltenboden (Fressbereich) |
| | | | Tiefstreu (Liegeboxen) | |

Insgesamt wurde in diesem Bestand folgendes Probenmaterial genommen und auf das Vorhandensein von STEC und thermophilen *Campylobacter* spp. untersucht:

Tabelle 13: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Betrieb 3

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Stuhlproben |
|------------------------|-----------|-------------------|---------------|-------------|
| STEC | 16 | 16 u. 1 Tankmilch | 4 Quellproben | n. u. |
| <i>Campylobacter</i> | 16 | 16 u. 1 Tankmilch | 4 Quellproben | n. u. |

n. u. : nicht untersucht

Von den zwei VIDAS-positiven Kotproben erwies sich eine Probe als PCR-positiv. Dieser auch isolierte Stamm konnte mit Hilfe des Api Campy®-Systems als *Campylobacter jejuni jejuni* identifiziert werden.

Auch in diesem Betrieb konnten weder in der Tankmilch und Einzelgemelksproben noch in den entnommenen Wasserproben (Brauchwasser) thermophile *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 3

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 16 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Milch | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brauchwasser | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n : Anzahl der entnommenen Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

In insgesamt 31 % der entnommenen Rinderkotproben konnten *stx1* und/oder *stx2* nachgewiesen werden; in Tankmilch und Einzelgemelksproben erbrachten die Untersuchungen übereinstimmend ein negatives Ergebnis. Allerdings konnte ein STEC-Nachweis in einer der Quellwasserproben geführt werden.

Tabelle 15: Nachweis von STEC:

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 16 | 0 | 4 | 1 | 5 |
| Milch | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brauchwasser | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 |

n: Anzahl der entnommenen Proben

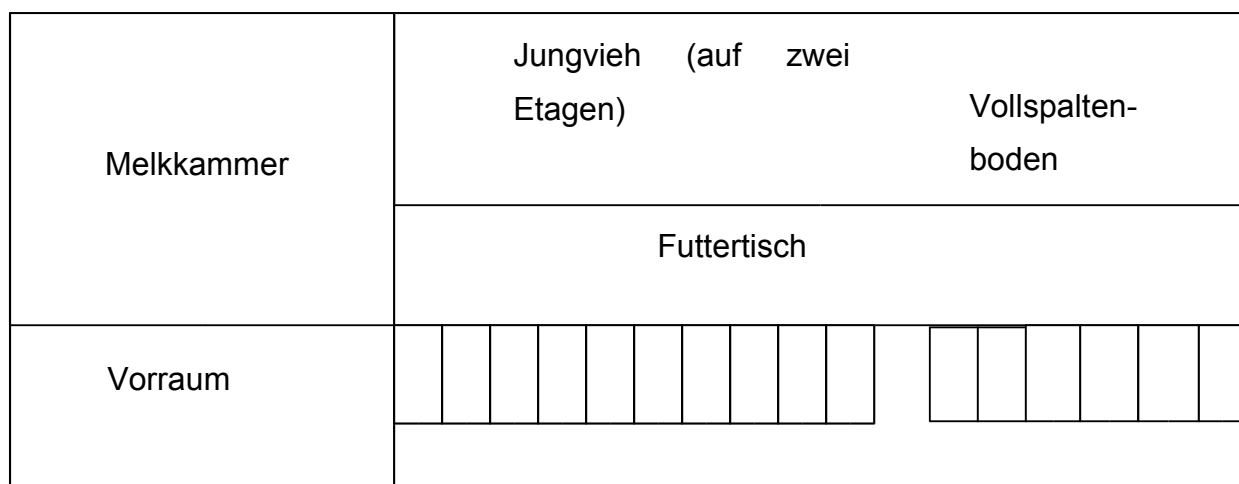
stx1, stx2: *stx1* und/oder *stx2* positiv

Bei den entnommenen Wasserproben handelte es sich um Quellen, die im Hofbereich gefasst und als Brauchwasser für die Tränke im Stall sowie für die Bewässerung des Gemüsegartens verwendet werden.

4.1.4 Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein

Dieser Hof ist ebenfalls ein anerkannter Bioland-Betrieb. Gehalten werden hier Bayerisches Fleckvieh und Pinzgauer Kühe, 14 Milchkühe, drei Mastbullen und Jungvieh. Es handelt sich um einen einseitigen Anbindestall mit angegliedertem zwei-etagigem Jungviehstall, wobei hier die Kälber auf dem umfunktionierten Heuboden mit „Ausblick“ in den Kuhbereich stehen. Kurzstände mit Kotrost und Hängekettenanbindung ziehen ein Melken am Standplatz mittels Rohrmelkanlage nach sich.

Abbildung 12: Skizze des Stalls von Betrieb 4



Folgende Proben konnten in diesem Bestand zu Untersuchungszwecken entnommen werden:

Tabelle 16: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Betrieb 4

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Stuhlproben |
|------------------------|-----------|-------------|--------------|-------------|
| STEC | 12 | 12 | n. u. | n. u. |
| <i>Campylobacter</i> | 12 | 12 | n. u. | n. u. |

n. u. : nicht untersucht

Eine von den zwölf entnommenen Kotproben konnte sowohl im Mini-VIDAS® als auch in der PCR als positiv identifiziert werden. Das Isolat wurde biochemisch als *Campylobacter coli* identifiziert. Auch in diesem Bestand konnten in den entnommenen Milchproben keine thermophilen *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden.

Tabelle 17 : Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 4

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Milch | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n : Anzahl der entnommenen Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

In 9 von 12 der in dem Bestand entnommenen Kotproben wurden STEC nachgewiesen. Trotz dieses hohen Prozentsatzes waren alle Milchproben, auch diejenigen, die bei Tieren mit positiven Kotproben gewonnen wurden, STEC-negativ.

Tabelle 18: Nachweis von STEC, Betrieb 4

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 12 | 1 | 4 | 4 | 9 |
| Milch | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der entnommenen Proben

stx1, *stx2*: *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.1.5 Zusammenfassung der Status-quo-Untersuchung im Stall

Fasst man die Ergebnisse der Status-quo-Untersuchung zusammen, ergeben sich nachfolgende Resultate:

Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse für thermophile *Campylobacter* spp.,
Betrieb 1 - 4

| Probenmaterial | n | <i>Campylobacter</i> | | | | | |
|----------------|----|----------------------|---------|-------------|-------------------|-----------------|--------|
| | | ELFA (%) | PCR (%) | Anzucht (%) | <i>jejuni</i> (%) | <i>coli</i> (%) | andere |
| Rinderkot | 79 | 31 (39) | 17 (22) | 17 (22) | 16 (20) | 1 (1) | 0 |
| Milch | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

n: Anzahl der untersuchten Proben

Tabelle 20: Zusammenfassung der Ergebnisse für STEC, Betrieb 1 - 4

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> (%) | <i>stx2</i> (%) | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> (%) | Summe STEC (%) |
|----------------|----|-----------------|-----------------|--------------------------------|----------------|
| Rinderkot | 79 | 7 (9) | 15 (19) | 12 (15) | 34 (43) |
| Milch | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 7 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Stuhlproben | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: *stx1* und/oder *stx2* positiv

Es lässt sich somit feststellen, dass etwa 20 % der untersuchten Tiere *Campylobacter*- und etwa 43 % STEC-positiv sind. Kein Bestand war völlig frei von einem dieser beiden Erreger. Eine der untersuchten Brauchwasserproben war ebenfalls STEC-positiv; allerdings konnten in keiner der entnommenen Milchproben thermophile *Campylobacter spp.* oder STEC detektiert werden.

4.2 Erster Untersuchungsdurchgang auf den Almen

Da im Sommer 2004 das Wetter bis Anfang Juni im gesamten Alpenraum sehr unbeständig war und die Schneefallgrenze bei etwa 1600 m ü. d. M. lag, konnten die vier Betriebe erst Mitte bis Ende Juni auftriebten. Die ersten Untersuchungen auf den Almen fanden somit im Zeitraum von Anfang Juli bis Anfang August statt.

4.2.1 Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu

Bei diesem Betrieb ergab sich das Problem, dass im Ostallgäu auf Gemeinschaftsalpen aufgetrieben wird, die vom Alpwirtschaftlichen Verein bewirtschaftet werden, d. h., nicht alle Tiere eines Landwirtes kommen gemeinsam auf eine Alpe, und der Landwirt hat auch keinerlei Einflussmöglichkeiten auf den Senn, der die Tiere betreut. Dieser wird direkt vom Alpwirtschaftlichen Verein angestellt. Da einige der Senner nicht bereit waren, auf ihren Alpen Untersuchungen durchführen zu lassen, konnten nur bei zwei der ursprünglich 10 untersuchten Milchkühe auf zwei unterschiedlichen Alpen Proben entnommen werden.

Da das Ziel dieser Untersuchung allerdings hauptsächlich der gesundheitliche Verbraucherschutz war, wurden die beiden Alpen, auf denen sich die bereits im Stall untersuchten Tiere befanden, komplett beprobt, um den mikrobiologischen Zustand der dort abgegebenen Lebensmittel beurteilen zu können.

Insgesamt wurde von beiden Alpen folgendes Probenmaterial entnommen:

Tabelle 21: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Alpe 1 von Betrieb 1

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Lebensmittel |
|------------------------|-----------|-------------|--------------|--------------|
| STEC | 10 | 10 | 1 | n. u. |
| <i>Campylobacter</i> | 10 | 10 | 1 | n .u. |

n. u. : nicht untersucht

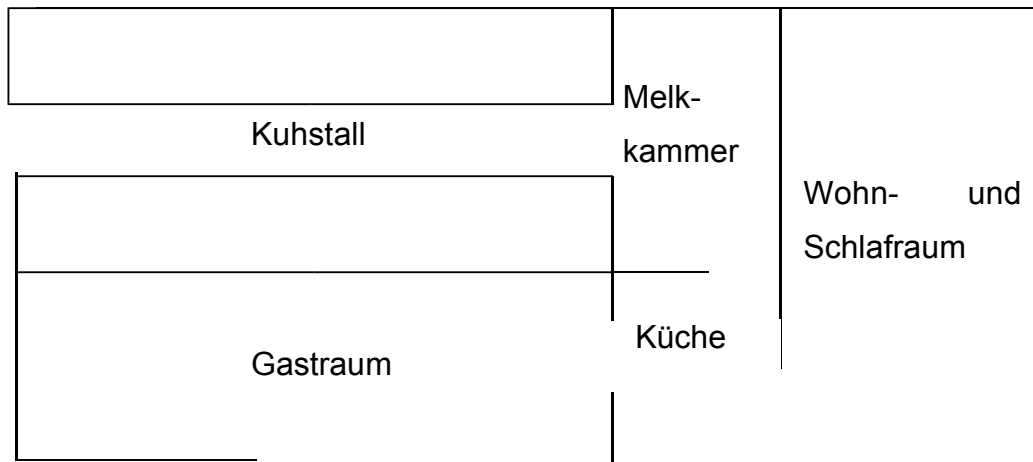
Tabelle 22: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Alpe 2 von Betrieb 1

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Lebensmittel |
|------------------------|-----------|-------------|--------------|--------------|
| STEC | 7 | 7 | 1 | 1 (Butter) |
| <i>Campylobacter</i> | 7 | 7 | 1 | 1 (Butter) |

Alpe 1, eine Sennalpe, liegt auf österreichischem Staatsgebiet, wird aber traditionell von deutscher Seite aus beschlagen. Auf der Alpe (ca. 1000 m ü. d. M.) sind im Sommer generell 11 Kühe der Rasse Allgäuer Braunvieh und Fleckvieh, in diesem Jahr aus 7 unterschiedlichen landwirtschaftlichen Betrieben, sowie zwei Ziegen beheimatet. Die Alpe wird von einem Senn und seiner Frau bewirtschaftet. Neben Brotzeit und Kuchen wird auch Rohmilch an Wanderer abgegeben.

Der Stall (zweireihige Anbindehaltung) wird nur zu den Melkzeiten genutzt, ansonsten sind die Tiere Tag und Nacht auf der Weide. Gemolken wird mit zwei Melkzeugen in Milchkannen, die dann in den Milchtank geleert werden. Die Wasserversorgung für Mensch und Tier erfolgt über eine gemeinsame Leitung, sowohl im Stall als auch für die Tränken auf der Weide.

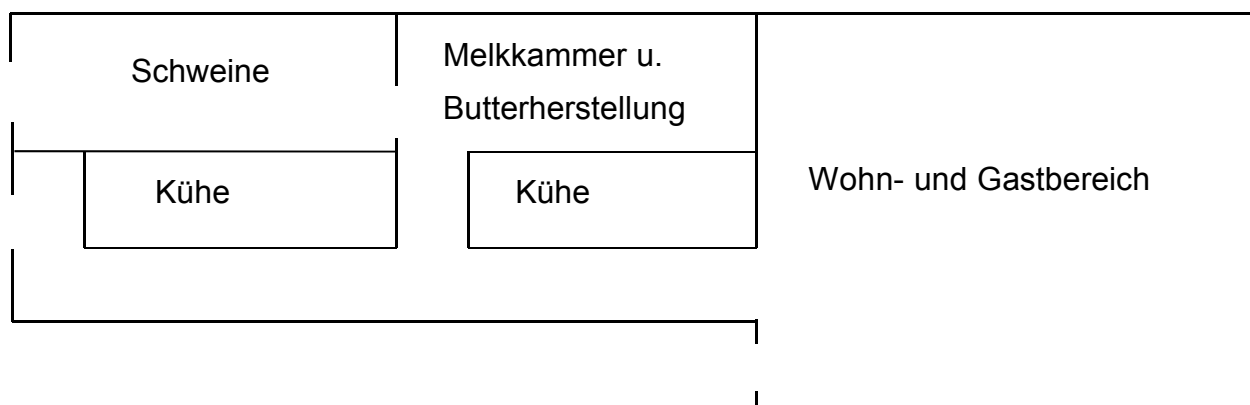
Abbildung 13: Skizze der Alpe 1 des landwirtschaftlichen Betriebs 1



Alpe 2 liegt an der Bergstation einer Kabinenseilbahn in einem Ostallgäuer Ski- und Wandergebiet (ca. 1400 m ü. d. M.). Die Alpe ist entweder zu Fuß oder mit der Seilbahn, die im Sommer auch die Versorgung übernimmt, zu erreichen. Beschlagen ist sie mit 7 Kühen der Rasse Allgäuer Braunvieh aus drei unterschiedlichen Betrieben und 5 Mastschweinen. Es handelt sich also um eine typische Mischalpe, wie man sie im Allgäu noch sehr häufig findet. An Wanderer werden Brotzeiten, Kuchen, selbst-erzeugte Butter und Rohmilch abgegeben.

Der Stall (einreihige Anbindehaltung) wird ebenfalls nur zu den Melkzeiten genutzt, ansonsten befinden sich die Tiere auf der Hochweide. Gemolken wird mit zwei Melkzeugen in Eimer, die dann in den Milchtank geleert werden. Die Wasserversorgung von Mensch und Tier ist, ebenso wie bei Alpe 1, identisch.

Abbildung 14: Skizze der Alpe 2 des landwirtschaftlichen Betriebs 1



Da eine Beprobung der beiden Alpen zur Melkzeit aufgrund der schlecht zugänglichen Lage nicht möglich war, wurden den beiden Sennern über das Veterinäramt Marktoberdorf Behältnisse zur Entnahme von Milch- und Kotproben geschickt, so dass das Probenmaterial bereits morgens entnommen werden konnte. Im Laufe des Tages wurden die Proben abgeholt und umgehend untersucht. Die Wasserproben sowie die Lebensmittelprobe auf Alpe 2 konnten direkt vor Ort gewonnen werden.

Thermophile *Campylobacter* spp. konnten bei beiden Alpen ausschließlich in einem Teil der Kotproben (10 % und 43 %) nachgewiesen werden.

Tabelle 23: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Alpe 1

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Milch | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

n: Anzahl der untersuchten Proben

Tabelle 24: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Alpe 2

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|---|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 7 | 3 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| Milch | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Butter | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

n: Anzahl der untersuchten Proben

Ebenso wie bei der Untersuchung auf thermophile *Campylobacter* spp. konnten auch einige Rinderkotproben (30 % und 57 %) als STEC-positiv identifiziert werden, der Nachweis von STEC aus Milch, Butter und Wasser war allerdings negativ.

Tabelle 25: Nachweis von STEC, Alpe 1

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 10 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| Milch | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

Tabelle 26: Nachweis von STEC, Alpe 2

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|---|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 7 | 0 | 2 | 2 | 4 |
| Milch | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Butter | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.2.2 Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu

Die Mischalpe des landwirtschaftlichen Betriebes 2 ist Eigentum der nahegelegenen Stadt und wird aufgrund eines Pachtvertrages seit Jahren durch denselben Landwirt beslagen. Während des Sommers verlässt die gesamte Familie den etwa 25 Kilometer entfernt gelegenen Heimathof und zieht mit 30 Milchkühen (Allgäuer Braunvieh), einigen Kälbern, 10 Mastschweinen und einem Bayerischen Kaltblut auf die 1050 m ü. d. M. gelegene Alpe.

Aus der gewonnenen Milch kann täglich ein Laib Bergkäse (Hartkäse) hergestellt werden, der dann bis zu 11 Monate im Käsekeller der Alpe reift. An Wanderer wird Hartkäse aus dem letzten Jahr, gegen Ende des Alpsommers auch diesjähriger Käse, aus Sicherheitsgründen aber keine Rohmilch abgegeben.

Der Stall (zweiseitige Anbindehaltung) dient nur zum Melken und als Unterkunft für die Mastschweine, die aus tierseuchenhygienischen Gründen nicht mehr im Freilauf auf der Alpe gehalten werden dürfen. Gemolken wird mit drei Melkzeugen in Milchkannen, die dann per Hand in den Milchtank geleert werden. Eine Rohrmelkanlage existiert, ebenso wie auf den anderen Almen, nicht. Als Wasserversorgung für die Tiere dient Bergbachwasser, das aufbereitet und abgekocht auch für die Trinkwasserversorgung (inklusive der Käseherstellung) genutzt wird.

Abbildung 15: Skizze der Alpe des landwirtschaftlichen Betriebs 2

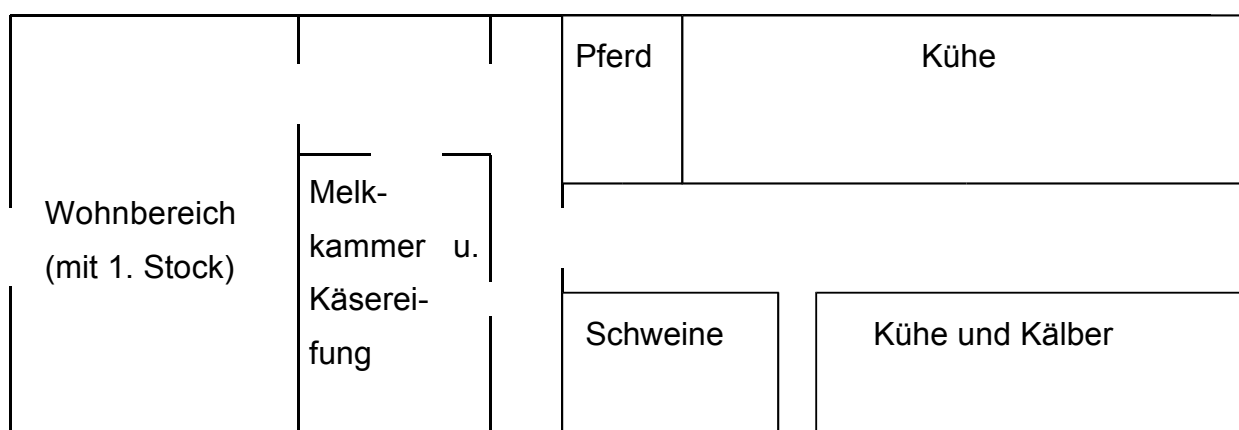


Tabelle 27: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Betrieb 2

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Lebensmittel |
|------------------------|-----------|-------------|--------------|--------------|
| STEC | 29 | 26 | 1 | 1 (Hartkäse) |
| <i>Campylobacter</i> | 29 | 26 | 1 | 1 (Hartkäse) |

Von den sieben Kotproben, die sich im ELFA als positiv erwiesen, ließen sich sechs Ergebnisse mittels PCR bestätigen. Bei all diesen Proben gelang auch die Anzucht der Isolate, die als *Campylobacter jejuni jejuni* identifiziert wurden.

In diesem Bestand wurde auch eine Einzelgemelksprobe entnommen, die sich biochemisch als *Campylobacter jejuni*-positiv herausstellte; Lebensmittel und Wasser waren allerdings *Campylobacter*-negativ.

Tabelle 28: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 2

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 29 | 7 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 |
| Milch | 26 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Hartkäse | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

n: Anzahl der untersuchten Proben

24 % der entnommenen Rinderkotproben erwiesen sich als STEC-positiv. In den übrigen Materialien konnte allerdings kein STEC detektiert werden.

Tabelle 29: Nachweis von STEC, Betrieb 2

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 29 | 1 | 6 | 0 | 7 |
| Milch | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Bergkäse | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

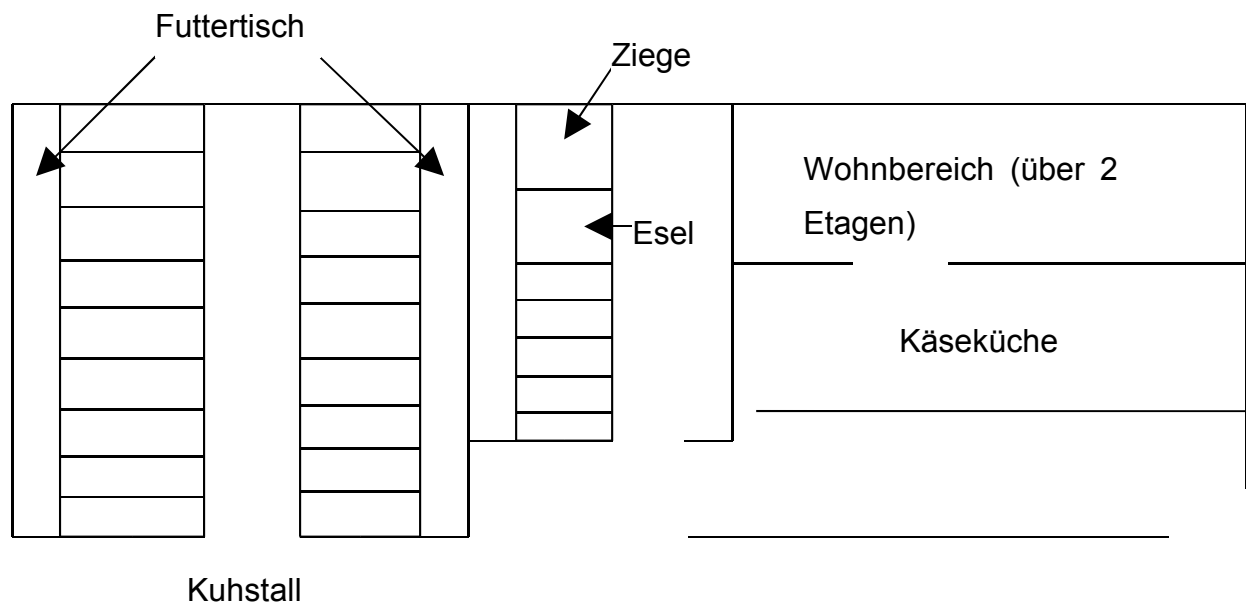
4.2.3 Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu

Auch bei dieser Alpe handelt es sich um eine für den Ostallgäuer Raum typische Mischalpe ca. 1000 m ü. d. M.. Neben den 22 Kühen (Allgäuer Braunvieh) verbringen mehrere Mastschweine, eine Bunte Deutsche Edelziege und ein Esel den Sommer auf der Alpe. Betreut werden sie von einer Person, die morgendliche und abendliche Melkarbeit erledigt die Familie gemeinsam, die Käseherstellung übernimmt der Bruder des Landwirts. An Wanderer werden halbfester Schnittkäse, der mindestens 1 Monat im Käsekeller der Alpe reift, und Rohmilch abgegeben.

Bei dem Stall, der die Tiere nur zur Melkzeit beherbergt, handelt es sich um eine zweiseitige Anbindehaltung. Den Schweinen dient der Keller der am Hang gelegenen Alpe mit eingezäuntem Auslauf als Sommerdomizil. Auch der Esel und die Ziege weiden den gesamten Tag frei auf der Alpe und kommen nur zur Melkzeit gemeinsam mit den Kühen in den Stall.

Gemolken wird mit vier Melkzeugen in Eimer, die dann per Hand zuerst in größere Milchkannen geleert werden. Diese wiederum müssen dann, ebenfalls von Hand, in den Milchtank umgefüllt werden. Der Landwirt plant allerdings, eine Rohrmelkanlage zu installieren. Die Wasserversorgung von Tier und Mensch erfolgt über Quellwasser, das allerdings für den menschlichen Gebrauch und zur Käseherstellung abgekocht wird.

Abbildung 16: Skizze der Alpe des landwirtschaftlichen Betriebs 3



Folgendes Probenmaterial konnte entnommen und auf STEC und thermophile *Campylobacter* spp. untersucht werden:

Tabelle 30: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Betrieb 3

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Lebensmittel |
|------------------------|-----------|-------------|--------------|--------------|
| STEC | 19 | 20 | 8 | 2 (Käse) |
| <i>Campylobacter</i> | 19 | 20 | 8 | 2 (Käse) |

Insgesamt konnte von den zwei ELFA-positiven Kotproben eine Probe über die PCR bestätigt werden. Das aus dieser Probe gewonnene Isolat wurde als *Campylobacter jejuni jejuni* identifiziert. In den hier entnommenen Milch-, Lebensmittel- und Wasserproben konnten keine thermophilen *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden.

Tabelle 31: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp.

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|------------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 19 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Milch | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| halbf. Schnittk. | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Quellwasser | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

halbf. Schnittk. : halbfester Schnittkäse

11 % der in diesem Bestand untersuchten Tiere konnten anhand der entnommenen Kotproben als STEC-positiv identifiziert werden. Ebenso wie bei der Untersuchung auf thermophile *Campylobacter* spp. waren alle Milch-, Lebensmittel- und Wasserproben negativ.

Tabelle 32: Nachweis von STEC, Betrieb 3

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|------------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 19 | 1 | 2 | 1 | 4 |
| Milch | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| halbf. Schnittk. | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

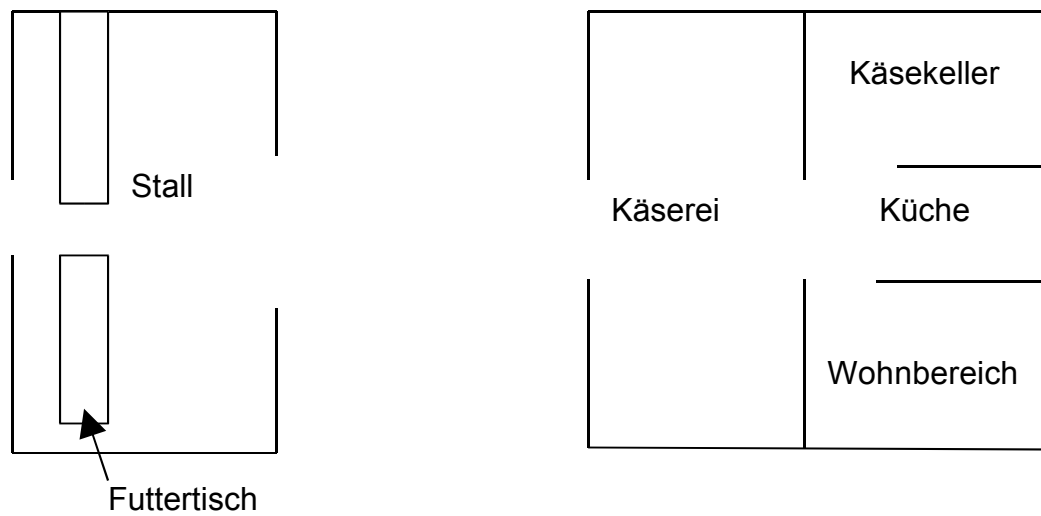
halbf. Schnittk.: halbfester Schnittkäse

4.2.4 Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein

Der gesamte Bestand des Biobetriebs wird auf eine etwa 25 km vom Heimathof entfernte Alm aufgetrieben, auf der sich zwei Sennerinnen den Sommer lang um die Tiere kümmern. Im Gegensatz zu den Allgäuer Alpbetrieben werden auf dieser Alm ausschließlich Rinder (Kühe und Ochsen) gehalten. Der Kaser (Almhütte) liegt ca. 1100 m ü. d. M. auf österreichischem Staatsgebiet, das Weidegelände gehört dem Freistaat Bayern und erstreckt sich über 40 ha Wald, Steilhang und Weidefläche bis auf 1700 m ü. d. M..

Gemolken wird mit zwei Melkzeugen in Eimer, die dann in den Milchtank geleert werden. Die Wasserversorgung für Mensch und Tier erfolgt über Brunnenwasser, das für die Benutzung bei der Käseherstellung und für den menschlichen Verzehr abgekocht wird. Da die Alm auf die Bewirtung von Wanderern eingerichtet ist, werden hier neben selbthergestelltem Almkäse (halbfester Schnittkäse), der nach der Herstellung etwa einen Monat im Käsekeller der Alm reift, und Weichkäse auch Getränke und Brotzeiten abgegeben.

Abbildung 17 : Skizze der Alm des landwirtschaftlichen Betriebs 4



Insgesamt konnte für die Untersuchungen auf STEC und thermophile *Campylobacter* spp. folgendes Probenmaterial entnommen werden:

Tabelle 33: Probenmaterial und Untersuchungsparameter, Betrieb 4

| Untersuchungsparameter | Kotproben | Milchproben | Wasserproben | Lebensmittel |
|------------------------|-----------|-------------|--------------|--------------|
| STEC | 12 | 11 | 1 | 2 (Käse) |
| <i>Campylobacter</i> | 12 | 11 | 1 | 2 (Käse) |

Von den 12 entnommenen Kotproben erwiesen sich vier als ELFA-positiv. Allerdings ließ sich keine der positiven Proben mit PCR und in der Anzucht bestätigen. Die entnommenen Milch- und Käseproben waren ebenso wie die Wasserprobe in der VIDAS- und PCR-Untersuchung negativ.

Tabelle 34: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 4

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 12 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Milch | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Almkäse | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Quellwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

Almkäse: 1 Probe Weichkäse und 1 Probe halbfester Schnittkäse

Von den 12 untersuchten Kotproben wurden vier als STEC-positiv detektiert. Ebenso wie bei den Untersuchungen auf thermophile *Campylobacter* spp. war es aber auch hier nicht möglich, STEC in Milch, Lebensmitteln und Wasser nachzuweisen.

Tabelle 35: Nachweis von STEC, Betrieb 4

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 12 | 1 | 2 | 1 | 4 |
| Milch | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Almkäse | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Quellwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

Almkäse: 1 Probe Weichkäse und 1 Probe halbfester Schnittkäse

4.2.5 Zusammenfassung der ersten Probenentnahme auf den Almen

Zieht man eine Bilanz dieses ersten Untersuchungsdurchgangs auf den Almen, so zeigen sich folgende Ergebnisse: Von den 75 entnommenen Rinderkotproben wurden 11 als *Campylobacter*-positiv und 22 als STEC-positiv detektiert. Somit schieden ca. 15 % der auf den Almen untersuchten Tiere thermophile *Campylobacter* spp. und etwa 29 % STEC aus. Eine Einzelgemelksprobe wurde als *Campylobacter*-positiv

identifiziert. Das entspricht einem Anteil von 1,3 % an den gesamten entnommenen Milchproben. In Lebensmittel- und Wasserproben konnten weder thermophile *Campylobacter* spp. noch STEC nachgewiesen werden.

Tabelle 36: Zusammenfassung der Ergebnisse für thermophile *Campylobacter* spp., Betrieb 1 - 4

| Probenmaterial | n | ELFA (%) | PCR (%) | Anzucht (%) | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|----------|---------|-------------|----------------------|-----------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> (%) | <i>coli</i> (%) | andere |
| Rinderkot | 75 | 17 (23) | 11 (15) | 11(15) | 11 (15) | 0 | 0 |
| Milch | 76 | 1 (1) | 1 (1) | 1 (1) | 1 (1) | 0 | 0 |
| Lebensmittel | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

Auch bei dieser Probenentnahme konnten in jedem der teilnehmenden Betriebe Tiere gefunden werden, die STEC mit dem Kot ausschieden. Allerdings wurde weder in Milch, Lebensmitteln oder Wasser STEC nachgewiesen.

Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse für STEC, Betrieb 1 - 4

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> (%) | <i>stx2</i> (%) | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> (%) | Summe STEC (%) |
|----------------|----|-----------------|-----------------|--------------------------------|----------------|
| Rinderkot | 75 | 5 (7) | 12 (16) | 5 (7) | 22 (29) |
| Milch | 76 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lebensmittel | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.3 Zweiter Untersuchungsdurchgang auf den Almen

Nach Beendigung des ersten Untersuchungsdurchganges wurde Mitte August bis Mitte September ein weiteres Mal in jedem der teilnehmenden Betriebe Probenmaterial entnommen. Zwischen den beiden Probenentnahmen lagen also etwa 4 bis 6 Wochen.

4.3.1 Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu

Vier der beim ersten Mal beprobten 10 Tiere standen bereits trocken und wurden von der Alpe 1 auf eine Galtalpe gebracht, so dass eine Beprobung nicht mehr möglich war. Eine ähnliche Situation war auf Alpe 2 anzutreffen.

Von den insgesamt 12 entnommenen Rinderkotproben erwiesen sich zwei im ELFA als positiv. Beide Ergebnisse konnten allerdings weder durch die PCR noch in der Anzucht bestätigt werden. Milch- und Wasserproben waren auch bei diesem Untersuchungsdurchgang *Campylobacter*-negativ.

Tabelle 38: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Alpe 1

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|---|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Milch | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brauchwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

Tabelle 39: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Alpe 2

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|---|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 6 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Milch | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brauchwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

Wie aus den Tabellen 40 und 41 ersichtlich ist, waren von den insgesamt 12 untersuchten Rinderkotproben drei (25 %) STEC-positiv; allerdings konnten weder in der Milch noch in der Wasserversorgung der beiden Betriebe STEC nachgewiesen werden.

Tabelle 40: Nachweis von STEC, Alpe 1

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|---|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 6 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Milch | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brauchwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

Tabelle 41: Nachweis von STEC, Alpe 2

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|---|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 6 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| Milch | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brauchwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.3.2 Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu

Beim zweiten Untersuchungsdurchgang konnten 29 Rinderkot-, 29 Milch-, eine Hartkäse- und eine Bergbachprobe entnommen werden. Der Hartkäse war der erste, der aus diesem Jahr nach einer Reifezeit von vier Monaten abgegeben wurde.

Von den 29 entnommenen Rinderkotproben konnten 6 mittels des ELFAS als positiv detektiert werden. Durch Anzucht und PCR bestätigten sich allerdings nur zwei dieser Ergebnisse. Milch, Hartkäse und das Bergbachwasser waren *Campylobacter*-frei.

Tabelle 42: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 2

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 29 | 6 | 2 | 2 | 0 | 0 | |
| Milch | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Hartkäse | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Bergbach | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

In 14 der 29 entnommenen Kotproben (48 %) konnte STEC festgestellt werden, allerdings konnte auch in diesem Fall, ebenso wie bei der Untersuchung auf thermophile *Campylobacter* spp., weder in der Milch noch in der Lebensmittel- oder Wasserprobe ein STEC-Nachweis erfolgen.

Tabelle 43: Nachweis von STEC, Betrieb 2

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|----------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 29 | 0 | 13 | 1 | 14 |
| Milch | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hartkäse | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Bergbach | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.3.3 Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu

In diesem Betrieb konnten alle 22 Tiere des Bestandes beprobt werden. Neben Kot und Milch wurden auch zwei Proben des auf der Alpe hergestellten halbfesten Schnittkäses und insgesamt vier Proben der Wasserversorgung entnommen.

In den insgesamt 22 Rinderkotproben wurden sowohl mittels der ELFA-Untersuchung als auch über die PCR keine thermophilen *Campylobacter* spp. detektiert. Gleiches galt für Milch, Käse und Wasserproben.

Tabelle 44: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 3

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|------------------|----|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Milch | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| halbf. Schnittk. | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Quellwasser | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

halbf. Schnittk.: halbfester Schnittkäse

Von den 22 beprobten Kühen erwiesen sich insgesamt 6 Tiere (27 %) als STEC-Ausscheider. In den entnommenen Käse-, Milch- und Wasserproben gelang allerdings kein STEC-Nachweis.

Tabelle 45: Zusammenfassung der Ergebnisse für STEC:

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|------------------|----|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 22 | 3 | 1 | 2 | 6 |
| Milch | 22 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| halbf. Schnittk. | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Quellwasser | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

halbf. Schnittk.: halbfester Schnittkäse

4.3.4 Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein

Zwei Wochen vor Ende der Almsaison ging bei allen Tieren bereits die Milchleistung stark zurück; drei der insgesamt 12 Kühe standen zum Zeitpunkt der letzten Probennahme bereits trocken und wurden zu den Melkzeiten nicht mehr von der Weide in den Stall zurückgeholt. Insgesamt konnten deshalb nur noch 9 Tiere beprobt werden.

Von den 9 entnommenen Rinderkotproben erwiesen sich im Screening mittels des ELFA drei Proben als positiv. Diese Ergebnisse ließen sich aber weder durch die PCR noch in der Anzucht bestätigen. So kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um thermophile *Campylobacter* spp. handelt. Alle übrigen Proben (Milch, Almkäse, Wasser) waren *Campylobacter*-frei.

Tabelle 46: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp., Betrieb 4

| Probenmaterial | n | ELFA | PCR | Anzucht | <i>Campylobacter</i> | | |
|-----------------|---|------|-----|---------|----------------------|-------------|--------|
| | | | | | <i>jejuni</i> | <i>coli</i> | andere |
| Rinderkot | 9 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Milch | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| halb. Schnittk. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Quellwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

halb. Schnittk. : halbfester Schnittkäse

Insgesamt konnten vier der 9 Kotproben als STEC-positiv gewertet werden; in den Einzelgemelksproben und der Probe des Brunnenwassers, das in abgekochter Form auch für die Käseherstellung verwendet wird, war ein Nachweis von STEC nicht möglich. Allerdings konnte in der Almkäseprobe mittels Real-Time-PCR *stx1* detektiert werden; in der PCR war diese Probe jedoch STEC-negativ.

Tabelle 47: Nachweis von STEC, Betrieb 4

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> | Summe STEC |
|-----------------|---|-------------|-------------|----------------------------|------------|
| Rinderkot | 9 | 1 | 2 | 1 | 4 |
| Milch | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| halb. Schnittk. | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Quellwasser | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

halb. Schnittk.: halbfester Schnittkäse

4.3.5 Zusammenfassung der zweiten Probenentnahme auf den Almen

Insgesamt konnten während des zweiten Untersuchungsdurchgangs 72 Rinderkot-, 72 Einzelgemelks-, vier Käse- und 8 Wasserproben entnommen werden. Alle diese Proben wurden sowohl auf thermophile *Campylobacter* spp. wie auch auf STEC untersucht. Zieht man eine Gesamtbilanz dieser zweiten Untersuchung auf den Almen, zeigen sich folgende Ergebnisse:

27 der 72 entnommenen Rinderkotproben wurden als STEC-positiv identifiziert (35 %), 11 Proben erwiesen sich als VIDAS-positiv. Allerdings konnten davon nur zwei mittels PCR und Anzucht bestätigt werden. Bei beiden Stämmen handelte es sich gemäß des biochemischen Api Campy®-Identifizierungssystems um *Campylobacter jejuni jejuni*. In Milch und der Wasserversorgung ließen sich bei dieser Untersuchung weder STEC noch thermophile *Campylobacter* spp. nachweisen. Eine der Käseproben (halbfester Schnittkäse) erwies sich in der Real-Time-PCR als STEC-positiv.

Tabelle 48: Zusammenfassung der Ergebnisse für thermophile *Campylobacter* spp.,
Betrieb 1 - 4

| Probenmaterial | n | ELFA (%) | PCR (%) | Anzucht (%) | <i>Campylobacter</i> | | |
|----------------|----|----------|---------|-------------|----------------------|-----------------|------------|
| | | | | | <i>jejuni</i> (%) | <i>coli</i> (%) | andere (%) |
| Rinderkot | 72 | 11 (15) | 2 (3) | 2 (3) | 2 (3) | 0 | 0 |
| Milch | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lebensmittel | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wasser | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

ELFA: enzyme linked fluorescence immunoassay

Tabelle 49: Zusammenfassung der Ergebnisse für STEC, Betrieb 1 - 4

| Probenmaterial | n | <i>stx1</i> (%) | <i>stx2</i> (%) | <i>stx1</i> u. <i>stx2</i> (%) | Summe STEC-pos. |
|----------------|----|-----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| | | | | | (%) |
| Rinderkot | 72 | 5 (7) | 18 (25) | 4 (1) | 27 (38) |
| Milch | 72 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lebensmittel | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Wasser | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |

n: Anzahl der untersuchten Proben

stx1, *stx2*: Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* positiv

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des externen Methodenvergleichs mit dem NRL-Ec, Dessau, in Bezug auf die STEC-Diagnostik

Ein Teil der untersuchten Proben wurde direkt nach der Entnahme oder nach maximal einwöchiger sachgemäßer Lagerung an das NRL-Ec nach Dessau zur dortigen parallelen Untersuchung versandt. Ziel war es, die unterschiedlichen Methoden, die an beiden Instituten routinemäßig angewandt werden, zu vergleichen.

Bei der Untersuchung von Lebensmittelproben wurden am NRL-Ec die gemäß der Amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG vorgeschriebenen Methoden angewandt und

die anschließende Keimsuche mittels eines Kolonie-Immunoblots durchgeführt (Timm et al., 1998). Bei Wasserproben wurde ebenso verfahren. Bei der bei den eigenen Untersuchungen eingesetzten Methode handelte es sich um die oben beschriebene modifizierte Vorgehensweise gemäß der Amtl. Sammlung nach § 35 LMBG. Beide Methoden erbrachten eine Übereinstimmung in 100 % der untersuchten Proben.

Da für Rinderkotproben keine gesetzlich vorgegebenen Untersuchungsmethoden existieren, wurde in der eigenen Studie die oben beschriebene Kultivierungsmethode (Ausstrich auf ENDO-Selektivagar) eingesetzt, am NRL-Ec erfolgte eine Anreicherung einer Kotsuspension in mTSB-Bouillon mit Mitomycinzusatz über 18 Stunden in Schüttelkultur mit anschließender PCR direkt aus der Anreicherung (Timm et al., 1998). Bemerkenswert war, dass in einem Teil der Fälle unterschiedliche Tiere als STEC-positiv detektiert wurden.

Tabelle 50: Zusammenfassung der Ergebnisse für STEC (Angaben in % positiv. Tiere)

| Betrieb | Labor | Winterperio- de, Stall | Sommer , Alm (1. Unters.) | Sommer, Alm (2. Unters.) |
|---------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1 | vorl. Unters. | 41 | 41 | 25 |
| 1 | NRL-Ec | 59 | 35 | 33 |
| 1 | vorl. Unters. u. NRL-Ec | 70 | 47 | 42 |
| 4 | vorl. Unters. | 83 | 33 | 44 |
| 4 | NRL-Ec | n. u. | 17 | 56 |
| 4 | vorl. Unters. u. NRL-Ec | n. u. | 33 | 67 |

vorl. Unters.: vorliegende Untersuchung

Unters.: Untersuchung

n. u. : nicht untersucht

4.5 Zusammenfassung der weiterführenden Untersuchungen bei STEC-positiven Proben

Bei allen STEC-positiven Proben wurde eine Kolonieblothybridisierung zur Keimisolierung durchgeführt. Ein Teil der Isolate wurde an das RKI, Referenzlabor für Salmonellen und andere Enteritiserreger, Wernigerode, eingesandt, ein weiterer Teil der Serotypisierungsergebnisse stammt aus dem NRL-Ec, Dessau.

4.5.1 Zusammenschau der Keimisolierungsergebnisse

Insgesamt war bei 59 % (49) der positiv detektierten Rinderkotproben eine Keimisolierung mittels Kolonieblothybridisierung erfolgreich, ebenso gelang die Isolierung des Keimes aus der STEC-positiven Brauchwasserprobe; bei der als positiv detektierten Käseprobe war die Kolonieblothybridisierung allerdings nicht erfolgreich (Ausführliche Ergebnisse siehe Anhang 8.2).

Bei 73 % (36) der isolierten Keime konnte als weiterer Pathogenitätsfaktor das EHEC *hly*-Gen nachgewiesen werden, das alle STEC-Stämme auch phänotypisch auf dem Enterohämolysinagar ausprägten; bei einem Stamm (2 %) war zusätzlich sogar das *eae*-Gen vorhanden.

Tabelle 51: Keimisolierung Betrieb 1, Ostallgäu

| Zeitpunkt | STEC Isolate | <i>eae</i> -/ <i>hly</i> -pos. | Sorbit./Enterohämo. |
|---------------------------|--------------|--------------------------------|---------------------|
| Winterperiode (Stall) | 11 | 9 | 1/6 |
| Sommer, Alpe (1. Unters.) | 7 | 3 | 0/1 |
| Sommer, Alpe (2. Unters.) | 3 | 1 | 0/1 |

Unters.: Untersuchung

eae/hly: Untersuchung mittels Real-Time-PCR (LightCycler®) auf beide Pathogenitätsgene

Sorbit./Enterohämo.: Untersuchung auf die phänotypischen Merkmale der Sorbitfermentation und der Enterohämolysinbildung über Selektivnährböden

Tabelle 52: Keimisolierung Betrieb 2, Oberallgäu

| Zeitpunkt | STEC Isolate | <i>eae</i> -/ <i>hly</i> -pos. | Sorbit./Enterohämo. |
|---------------------------|--------------|--------------------------------|---------------------|
| Winterperiode (Stall) | 9 | 7 | 0/7 |
| Sommer, Alpe (1. Unters.) | 7 | 3 | 0/3 |
| Sommer, Alpe (2. Unters.) | 14 | 8 | 0/0 |

Unters.: Untersuchung

eae/hly: Untersuchung mittels Real-Time-PCR (LightCycler®) auf beide Pathogenitätsgene

Sorbit./Enterohämo.: Untersuchung auf die phänotypischen Merkmale der Sorbitfermentation und der Enterohämolysinbildung über Selektivnährböden

Tabelle 53: Keimisolierung Betrieb 3, Oberallgäu

| Zeitpunkt | STEC Isolate | <i>eae-/hly</i> -pos. | Sorbit-/Enterohämo. |
|---------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|
| Winterperiode (Stall) | 5 | 4 | 0/4 |
| Sommer, Alpe (1. Unters.) | 4 | 2 | 0/2 |
| Sommer, Alpe (2. Unters.) | 6 | 2 | 0/2 |

Unters.: Untersuchung

eae/hly: Untersuchung mittels Real-Time-PCR (LightCycler®) auf beide Pathogenitätsgene

Sorbit-/Enterohämo.: Untersuchung auf die phänotypischen Merkmale der Sorbitfermentation und der Enterohämolysinbildung über Selektivnährböden

Tabelle 54: Keimisolierung Betrieb 4, Traunstein

| Zeitpunkt | STEC Isolate | <i>eae-/hly</i> -pos. | Sorbit-/Enterohämo. |
|---------------------------|--------------|-----------------------|---------------------|
| Winterperiode (Stall) | 9 | 5 | 0/5 |
| Sommer, Alpe (1. Unters.) | 4 | 2 | 0/2 |
| Sommer, Alpe (2. Unters.) | 4 | 3 | 0/3 |

Unters.: Untersuchung

eae/hly: Untersuchung mittels Real-Time-PCR (LightCycler®) auf beide Pathogenitätsgene

Sorbit-/Enterohämo.: Untersuchung auf die phänotypischen Merkmale der Sorbitfermentation und der Enterohämolysinbildung über Selektivnährböden

4.5.2 Zusammenfassung der Serotypisierungsergebnisse

Insgesamt 14 der mittels Kolonieblothybridisierung gewonnenen Isolate (13 Isolate aus Rinderkotproben und 1 Isolat aus der Brauchwasserprobe) wurden an das RKI, Referenzlabor für Salmonellen und andere Enteritiserreger, Wernigerode, zur Serotypisierung eingesandt. Von 21 weiteren Stämmen stammen die Ergebnisse aus dem NRL-Ec, Dessau. Dort wurde eine Keimisolierung aus den Originalproben mittels Immunoblothybridisierung und eine anschließende Serotypisierung vorgenommen.

Tabelle 55: Serotypen in den einzelnen Betrieben (Rinderkot-Isolate)

| Betrieb | Serotypen | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------|----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|-------|
| | O1 | O6 | O22 | O74 | O91 | O103 | O113 | O116 | O175 | O179 | On.t. |
| Betrieb 1 | 1 | 0 | 5 | 0 | 4 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| Betrieb 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Betrieb 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Betrieb 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| gesamt | 1 | 2 | 8 | 1 | 6 | 1 | 4 | 3 | 1 | 2 | 5 |

Aus der Brauchwasserprobe von Betrieb 3 wurde der Serotyp Ont:H8 isoliert, ein Stamm, der ansonsten in diesem Betrieb nicht aufzufinden war.

4.6 Auswertung der Daten als Verlaufsuntersuchung

Ein Aspekt des vorliegenden Projektes war es, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob und in welcher Weise sich die Futter- und Haltungsbedingungsumstellung durch den Auftrieb auf die Almen auf die Anwesenheit von thermophilen *Campylobacter* spp. und STEC im Kot der einzelnen Tiere auswirkt. Deshalb werden hier die Ergebnisse der drei Betriebe, bei denen identische Tiere sowohl im Stall als auch auf der Alm untersucht wurden, gegenübergestellt. Die Auswertung erfasst nur solche Tiere, die in drei Probenentnahmen einbezogen werden konnten.

4.6.1 Thermophile *Campylobacter* species

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so ging die Ausscheidungsrate von 24 % im Stall, über 14 % bei der ersten Beprobung auf der Alm/Alpe auf 10 % bei der letzten Untersuchung zurück. Allerdings wurden bei jeder Probenentnahme unterschiedliche Tiere als positiv identifiziert.

Tabelle 56: Zusammenfassung der Ergebnisse für thermophile *Campylobacter* spp.

| Betriebe | n | Winterperiode, Stall (%) | Sommer Alm, 1. Unters. (%) | Sommer Alm, 2. Unters. (%) | mind. einmal positiv (%) |
|-----------|----|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Betrieb 2 | 24 | 10 (42) | 6 (25) | 5 (21) | 16 (67) |
| Betrieb 3 | 16 | 1 (6) | 1(6) | 0 | 2 (13) |
| Betrieb 4 | 9 | 1 (11) | 0 | 0 | 1 (11) |
| gesamt | 49 | 12 (24) | 7 (14) | 5 (10) | 19 (39) |

Unters.: Untersuchung

n: Anzahl der bei allen drei Probenentnahmen berücksichtigten Tiere

mind. einmal positiv: Anzahl der Tiere, die bei mindestens einer Probenentnahme positiv waren

4.6.2 Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der bei der Ausscheidung von thermophilen *Campylobacter* spp. detektierte Rückgang während der Almsaison in Bezug auf STEC nicht zu beobachten ist. Die Ausscheidungsrate geht zwar in allen drei Betrieben nach der Älpung zurück, steigt zum Ende der Almsaison aber wieder an. Auch hier gilt die bereits bei den thermophilen *Campylobacter* spp. beschriebene Beobachtung, dass es sich immer um unterschiedliche Tiere handelt, die STEC mit dem Kot ausscheiden (Ausführliche Ergebnisse siehe Anhang 8.2).

Tabelle 57: Zusammenfassung der Ergebnisse für STEC

| Betriebe | n | Winterperiode, Stall (%) | Sommer Alm, 1. Unters. (%) | Sommer Alm, 2. Unters. (%) | mind. einmal positiv (%) |
|-----------|----|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Betrieb 2 | 24 | 8 (33) | 5 (21) | 13 (54) | 18 (75) |
| Betrieb 3 | 16 | 5 (31) | 2 (13) | 4 (25) | 9 (56) |
| Betrieb 4 | 9 | 7 (78) | 2 (22) | 4 (44) | 8 (89) |
| gesamt | 49 | 20 (41) | 9 (18) | 21 (43) | 35 (71) |

Unters.: Untersuchung

n: Anzahl der bei allen drei Probenentnahmen berücksichtigten Tiere

mind. einmal positiv: Anzahl der Tiere, die bei mindestens einer Probenentnahme positiv waren

5 DISKUSSION

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) und thermophile *Campylobacter* spp. zählen in den letzten Jahren neben *Salmonella* spp. zu den wichtigsten bakteriellen Enteritisserregern. Beobachtet man die Entwicklung in anderen Ländern, beispielsweise den USA oder Großbritannien, ist davon auszugehen, dass zumindest die thermophilen *Campylobacter* spp. in den nächsten Jahren *Salmonella* spp. an der Spitze der meldepflichtigen Enteritis infectiosa-Fälle ablösen werden. Beiden Erregern ist gemeinsam, dass sie neben der eigentlichen gastrointestinalen Symptomatik auch in der Lage sind, postinfektiöse Syndrome auszulösen, die zu schweren gesundheitlichen Beeinträchtigungen der erkrankten Personen bis hin zum Tod führen können.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zum einen, einen Einblick in die Inzidenz und Prävalenz von STEC und thermophilen *Campylobacter* spp. bei gesunden Almkühen zu erhalten. Aus Untersuchungen ist bekannt, dass etwa 50 % der gesunden deutschen Schlachtrinder STEC beherbergen (Richter et al., 1997), in einer neueren Langzeitstudie in vier landwirtschaftlichen Betrieben werden Detektionsraten von 29 bis 82 % genannt (Geue et al., 2002). Für thermophile *Campylobacter* spp. existiert eine entsprechende Arbeit aus Kanada, die eine ähnliche Detektionsrate (51 %) für Schlachttiere angibt (Garcia et al., 1985). Daten für im Sommer geälpte Kühe lagen allerdings für Bayern, das Bundesland, in dem diese Form der Rinderhaltung noch immer eine Rolle spielt, nicht vor. Auf der Basis der Status-quo-Untersuchungen im Stall ist es des Weiteren auch möglich, eine Verlaufsuntersuchung durchzuführen und festzustellen, ob und in welcher Weise die Älpung einen positiven Einfluss auf die Ausscheidung von STEC und thermophilen *Campylobacter* spp. hat.

Daneben sollte im Interesse des gesundheitlichen Verbraucherschutzes untersucht werden, ob und in welchem Umfang auf Almen produzierte, naturbelassene Lebensmittel mit STEC und/oder thermophilen *Campylobacter* spp. kontaminiert sind. Da vor allem die Abgabe von Rohmilch an Wanderer und Berghütten gemäß § 8, Absatz 2 MilchV **nicht** den strengeren gesetzlichen Auflagen der Milch-ab-Hof-Abgabe unterliegt, ist hier ein größeres Gefährdungspotential vorstellbar.

5.1 Interner und externer Vergleich der einzelnen Untersuchungsmethoden

Zu Beginn der Auswertung der Untersuchungsergebnisse soll hier kurz auf die diskrepanten Ergebnisse eingegangen werden, die sich sowohl intern durch die Verwendung mehrerer unterschiedlicher Detektionsmethoden für beide gesuchten Bakterien, wie auch extern ergaben, da ein Teil der untersuchten STEC-Proben an das NRL-Ec in Dessau eingesandt wurde, wo eine andere Probenaufbereitung, als in der vorliegenden Studie eingesetzt, erfolgte. Ziel war es hierbei, am Ende der Studie einen Vergleich zwischen beiden Methoden durchführen zu können.

5.1.1 Untersuchungsmethoden bei thermophilen *Campylobacter* species

Betrachtet man die Ergebnisse der ELFA-Screening-Untersuchung im Vergleich zu den PCR-Ergebnissen, die im Wesentlichen mit den Resultaten aus der konventionellen Mikrobiologie übereinstimmen, so stellt man fest, dass in einigen Fällen positive Screeningergebnisse auftreten, die sich nicht mittels PCR und konventionellen mikrobiologischen Methoden bestätigen lassen. Dabei gab es allerdings erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Matrices.

Nach Untersuchungen von Klein et al. (2004) hat das in dieser Studie eingesetzte MiniVIDAS® CAM Assay im Vergleich zur konventionellen kulturtechnischen Methode in Anlehnung an ISO 10272 (Stand: 1995) bei natürlich kontaminierten Lebensmittel- und Geflügelkotproben eine Sensivität von 99,6 % und eine Spezifität von 97,2 %. Für die in der vorliegenden Studie untersuchten Lebensmittelproben (Milch, unterschiedliche Käsesorten, Butter und Wasserproben) konnte sogar eine Übereinstimmung von 100 % zwischen den ELFA-, PCR- und ISO-Ergebnissen festgestellt werden.

Anders sah es bei den untersuchten Rinderkotproben aus. Hier fand sich eine zum Teil sehr deutliche Diskrepanz zwischen den ELFA-Ergebnissen auf der einen Seite und der PCR sowie der kulturellen Methode auf der anderen Seite. Dafür sind mehrere Gründe vorstellbar:

- Im Gegensatz zum Geflügel, das überwiegend die auch menschenpathogenen thermophilen *Campylobacter jejuni*, *coli* und *lari* beherbergt (Glünder et al., 2004), finden sich beim Rind neben den Spezies *Campylobacter jejuni* und *coli* auch

andere, zum Teil thermophile, wie *Campylobacter hyointestinalis*, zum Teil auch mesophile bzw. thermotolerante *Campylobacter* spp., wie *Campylobacter fetus* (On, 1996, Inglis und Kalischuk, 2003). Nach Erfahrungen des lebensmittelmikrobiologischen Labors des LGL ist der MiniVIDAS® CAM Assay auch in der Lage, beispielsweise *Campylobacter fetus fetus*, zumindest in Reinkultur, zu detektieren. Da bei der Antigen-Antikörperreaktion, die diesem ELFA zugrunde liegt, Kreuzreaktionen mit anderen *Campylobacter* spp. nicht ausgeschlossen werden können, ist es durchaus denkbar, dass die unbestätigten MiniVIDAS®-positiven Proben auf die Detektion anderer, im Rinderkot vorhandener *Campylobacter* spp. zurückzuführen sind. In der PCR zeigen solche Isolate keine positiven Ergebnisse, da das verwendete Assay spezifisch *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* detektiert.

- Ein VIDAS®-positives Ergebnis lässt keine Aussage darüber zu, ob in der verwendeten Anreicherung lebende, vermehrungsfähige Mikroorganismen vorhanden sind, da der ELFA als Antigen-Antikörperreaktion nicht auf lebende Organismen angewiesen ist. Bei solchen Proben würde eine Kultivierung auf Selektiv- oder Blutagar zu keinem Erfolg führen. Des Weiteren können *Campylobacter* spp. in eine lebensfähige, aber nicht kultivierbare (viable, but non-culturable) Form übergehen, was eine Anzucht auch unter sonst optimalen Bedingungen unmöglich macht (Bartelt, 2004). Ebenso muss bedacht werden, dass Rinderkot eine sehr große Begleitflora (Schimmelpilze, Hefen, *Bacillus* spp.) enthält, die eine Kultivierung der sehr empfindlichen, vergleichsweise langsamwachsenden *Campylobacter* spp., erschwert (Inglis und Kalischuk, 2003). Ein Versuch, die Bebrütungstemperatur für die Anzucht einiger VIDAS-positiver Proben herabzusetzen, um auch für evtl. vorhandene mesophile *Campylobacter* spp. optimale Bedingungen zu schaffen, scheiterte trotz Filtration der Anreicherung vor Ausstrich auf Selektivplatten an der sich bei niedrigeren Temperaturen (25° C und 37° C) optimal vermehrenden Begleitflora (überwiegend Schimmelpilze und Hefen).

Festzuhalten ist allerdings, dass sich durch den parallelen Einsatz der drei Verfahrensweisen ELFA, PCR und kultureller Nachweis das Risiko einer falsch-negativen Detektion zumindest für die beiden humanpathogenen, lebensmittelrelevanten Spezies *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* minimiert.

5.1.2 Untersuchungsmethoden für Shiga Toxin-bildende *E. coli*

Bei der Untersuchung sowohl der Rinderkot- wie auch der Lebensmittelproben fiel auf, dass bei einem Teil der Proben die PCR ein negatives, die Real-Time-PCR aber ein positives Ergebnis für den Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* erbrachte. Ebenso kam es, vor allem bei der Detektion von *stx2*, in einigen Fällen zu einem positiven Ergebnis in der PCR, das sich in der Real-Time-PCR nicht bestätigen ließ. Aufgrund dieser Tatsache wurde für alle untersuchten Proben die PCR zur Untersuchung eingesetzt, jedes Ergebnis aber auch mittels Real-Time-PCR bestätigt.

Folgende Faktoren sind wahrscheinlich für diskrepante Ergebnisse verantwortlich zu machen:

- Das Temperatur-Zeit-Protokoll für die PCR wurde so modifiziert, dass eine PCR für *stx1* und *stx2* in einem Thermocycler möglich ist. Die dafür notwendige Modifikation der Annealing-Temperatur kann in einigen Fällen zu falsch-positiven Ergebnissen für *stx2* führen. Solche Proben erweisen sich dann allerdings in der Real-Time-PCR als negativ.
- Bei einigen Proben ergaben sich in der PCR nur schwache Banden, für die eine spezifische Auswertung nicht möglich war. Solche Proben wurden für die PCR als fraglich gewertet und mittels Real-Time-PCR nachuntersucht.
- Die PCR ist aufgrund der sich anschließenden Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung mit einem wesentlich höheren Kontaminationsrisiko behaftet und ist durch diese durchzuführenden Schritte auch fehleranfälliger als das System der Real-Time-PCR (Rottengatter, 2003).
- Die Real-Time-PCR weist u. a. dadurch, dass die Schwellenwertüberschreitung (C_t -Wert) als Detektionsgrundlage herangezogen wird - nicht wie bei der PCR die Signalintensität im Sinne einer Endpunktanalyse - eine höhere Sensitivität auf als das PCR-Assay. So kann es sein, dass eine geringe STEC-Kontamination nur mittels der Real-Time-PCR detektiert werden kann (Rottengatter, 2003).

Da die PCR allerdings für Lebensmittelproben gemäß den Vorgaben der Amtl. Sammlung nach § 35 LMBG vorgeschrieben ist und für humane Stuhlproben am LGL, Oberschleißheim, seit Jahren erfolgreich als Screening-Methode eingesetzt wird (Busch, 2002), wurde sie in dieser Arbeit für alle verwendeten Matrizes ebenfalls eingesetzt. Das Ergebnis des LightCyclers® wurde jedoch als „Goldstandard“ betrachtet.

Bei allen Real-Time-PCR-positiven Proben wurde zur Isolierung des Keimes eine Kolonieblot-Hybridisierung durchgeführt. Allerdings war nicht in allen Fällen eine Keimisolierung möglich; der Grund hierfür war teils, dass in einigen Proben nur geringe STEC-Keimzahlen vorhanden waren, die bei der der Kolonieblot-Hybridisierung vorausgehenden Anzucht von *Proteus* spp. überwuchert wurden. So ist eine Keimisolierungsrate von 60 % mittels Kolonieblothybridisierung im Routinelaborbetrieb als normal zu werten (Busch, 2004). Nach den Falldefinitionen des RKI zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern nach § 4, Absatz 2, IfSG gilt als labordiagnostischer Nachweis einer EHEC-Erkrankung der Nachweis (z. B. PCR) des Shiga Toxin-Gens (*stx1*, *stx2*) in Mischkulturen, Stuhlanreicherung oder im *E. coli*-Isolat (N. N., 2000, RKI, 2004). Für die Beurteilung der Rinderkotproben als STEC-positiv wurde deshalb ebenso verfahren, auch wenn eine Keimisolierung nicht möglich war. Lebensmittelproben dagegen können gemäß der Amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG und den Vorgaben des Arbeitskreises lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) nur dann als positiv bewertet werden, wenn der PCR-Nachweis des Shiga Toxin-Gens mit einem kulturelleren Nachweis des Keimes verbunden ist (Bräunig und Klein, 2001). So wäre die positive Käseprobe unter lebensmittelrechtlichen Gesichtspunkten als fraglich zu werten und eine Nachprobe anzufordern (Amtl. Sammlung nach § 35 LMBG, 2002)

5.1.3 Externer Methodenvergleich mit dem NRL-Ec, Dessau, in Bezug auf die STEC-Diagnostik

Ein Teil der entnommenen Originalproben wurde parallel zu den eigenen Untersuchungen an das NRL-Ec, Dessau eingesandt. Ziel war es, die unterschiedlichen verwendeten Methoden miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse aus den fünf gemeinsam durchgeführten Untersuchungsdurchgängen zeigen, dass bei den Rinderkotproben in keinem Fall eine hundertprozentige Übereinstimmung der

Ergebnisse erzielt werden konnte, so wie es bei den Lebensmittel- und Wasserproben der Fall war. Folgende Gründe wären für die diskrepanten Ergebnisse denkbar:

- Die Proben wurden zum Teil einige Tage gelagert, bis sie das NRL-Ec erreichten. Eine niedrigere Detektionsrate aufgrund von Lagerung und Transport ist nicht auszuschließen.
- Da bei allen fünf gemeinsam durchgeführten Untersuchungsdurchgängen auch jeweils verschiedene Tiere als positiv detektiert wurden, wäre die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass innerhalb der Kotproben, vor allem bei einem nur geringen Kontaminationsgrad, eine inhomogene Verteilung der STEC vorliegt, ähnlich wie es bei Salmonellen bekannt ist („Nesterbildung“). Divergierende Ergebnisse in diesem Laborvergleich wären somit nicht ausschließlich auf die beiden unterschiedlichen Methoden zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigen aber eindeutig, dass keine der beiden Methoden ein zuverlässigeres Detektionsergebnis liefert. Für ein hohes Probenaufkommen in einem Routinelabor ist aus personal- und vor allem raumkapazitiven Gründen wahrscheinlich die in der vorliegenden Studie eingesetzte Methode anzuwenden, auch wenn bei einem sehr geringen Kontaminationsgrad die Anreicherungsverfahren des NRL-Ec bessere Detektionsergebnisse liefert. Eine Auswirkung auf die anhand der vorliegenden Daten erstellte Verlaufsuntersuchung haben die höheren Detektionsraten allerdings nicht.

5.2 Bewertung der Verlaufsuntersuchung bei drei landwirtschaftlichen Betrieben

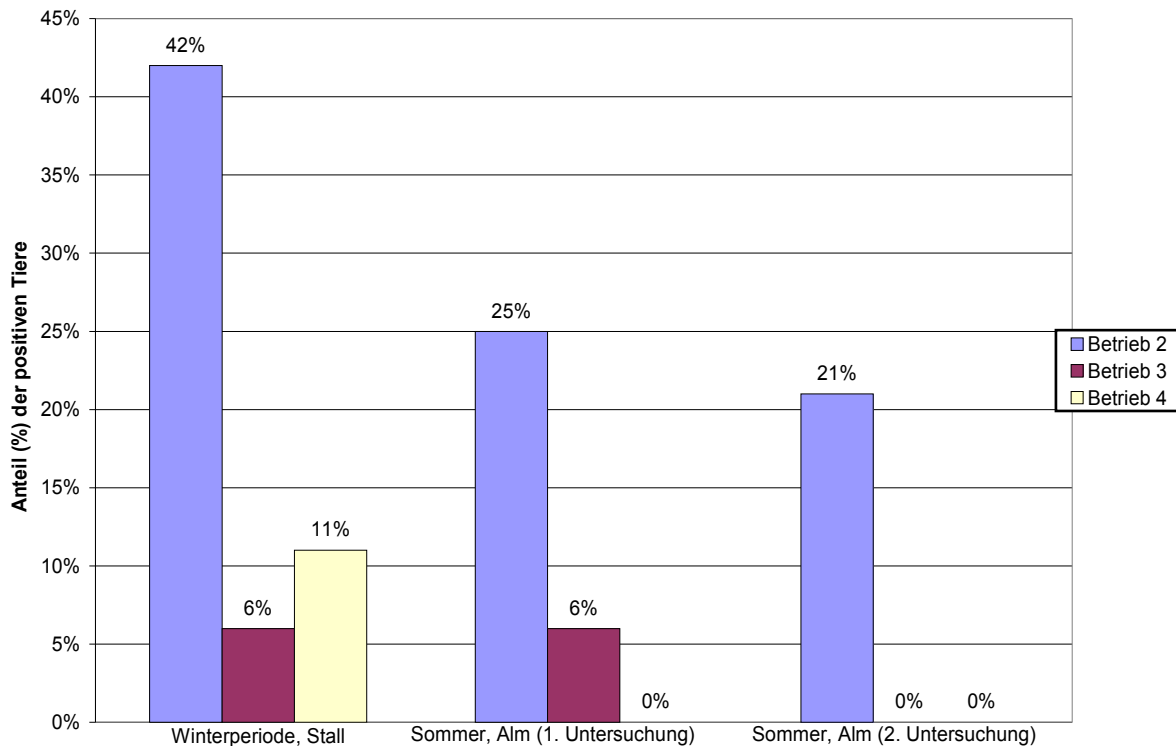
Eine Verlaufsuntersuchung hinsichtlich der STEC- und *Campylobacter*-Ausscheidung im Rinderkot, wurde nur bei drei der insgesamt vier beteiligten Betriebe durchgeführt, da bei einem Betrieb ein Teil der im Winter beprobten Tiere anschließend auf der Alpe nicht mehr untersucht werden konnten (siehe unter 4).

5.2.1 Verlaufsuntersuchung in Bezug auf thermophile *Campylobacter* species

Berücksichtigt wurden bei dieser Auswertung nur diejenigen Tiere, die bei allen drei Untersuchungen beprobt werden konnten.

Im Vergleich zu den Untersuchungen während der Stallperiode war in den Sommermonaten ein deutlicher Rückgang der *Campylobacter*-Ausscheidung zu beobachten. Bei zwei der drei landwirtschaftlichen Betriebe sank die Detektionsrate im Sommer sogar auf 0 % ab:

Abbildung 18: Verlaufsuntersuchung thermophile *Campylobacter* spp. (Rinderkot)



Auf welche Faktoren der Rückgang der Detektionsrate von thermophilen *Campylobacter* spp. im Kot der untersuchten Rinder zurückzuführen ist, kann lediglich hypothetisch angesprochen werden. Fest steht, dass die Älpung der Tiere im Sommer eine deutliche Haltungs- und Fütterungsumstellung bedingt, selbst wenn zwei der drei in der Untersuchung berücksichtigten Betriebe als anerkannte Biobetriebe auch im Stall auf den Einsatz von Milchleistungsfutter verzichten. Nach einer amerikanischen Studie ist die Ausscheidung von *E. coli* O157:H7 bei Rindern auch von der Fütterung

abhängig (Hovde et al., 1999); in Bezug auf thermophile *Campylobacter* spp. existieren solche Studien allerdings nur im Zusammenhang mit der Broilerfütterung (Line et al., 1998) und mit für diese Arbeit nicht relevanten Fütterungsmethoden bei Rindern, z. B. Fütterung von Luzerne und Baumwollsaamen (Wesley et al., 2000). Neben der Untersuchung von Hovde et al. (1999), in der bei experimenteller Kontamination der Tiere mit *E. coli* O157:H7 ein Zusammenhang zwischen einer Verlängerung der Ausscheidung des genannten Bakteriums und der erfolgten Heufütterung der Tiere belegt werden konnte, existiert eine weitere Studie über eine Reduktion der Ausscheidung pathogener Mikroorganismen durch eine Fütterungsumstellung, beispielsweise über die deutliche Verringerung der Konzentration von *Listeria monocytogenes* im Kot von Milchrindern nach Weideaustrieb (Husu, 1990).

So kann vermutet werden, dass die Futterumstellung, die mit der Älpung der Tiere verbunden war, dazu beitrug, die Ausscheidung thermophiler *Campylobacter* spp. zu vermindern.

Ein weiterer Umstand, der zur Reduktion der *Campylobacter*-Ausscheidung beigetragen haben könnte, ist darin zu sehen, dass die Tiere auf der Alm Tag und Nacht im Freien gehalten und nur für die relativ kurzen Melkzeiten eingestallt werden. Der Kontakt mit dem eigenen Kot und dem der anderen Kühe ist somit unwahrscheinlicher als bei der beengten Stallhaltung. In diesem Zusammenhang ist das Eintrocknen des Kotes und eine Inaktivierung thermophiler *Campylobacter* spp. durch UV-Licht, Wärme und O₂ möglich (Baily et al., 2003).

Zu denken gibt allerdings, dass in den zwei Betrieben, wo bei beiden Untersuchungen auf den Alpen thermophile *Campylobacter* spp. gefunden wurden, die ausscheidenden Tiere während der Untersuchungsdurchgänge im Winter und im Sommers nicht identisch waren. In beiden Betrieben wurden Tiere identifiziert, die im Winter *Campylobacter*-negativ waren, im Sommer allerdings bei mindestens einer Probenentnahme *Campylobacter*-positiv. Bekannt ist, dass Kühe thermophile *Campylobacter* spp., ähnlich wie STEC, phasenweise ausscheiden (Robinson, 1982). Unter Stressbedingungen kann, gerade bei persistenten Infektionen, die Ausscheidungsrate ansteigen (Garcia et al., 1985). So ist nicht auszuschließen, dass ein höherer Prozentsatz der einbezogenen Tiere latenter Träger von thermophilen *Campylobacter* spp. ist, als die festgestellte Detektionsrate vermuten lässt.

Einige Studien beschreiben die Saisonalität der Ausscheidung von thermophilen *Campylobacter* spp. (Meanger und Marshall, 1988, Stanley et al., 1998, Stanley und Jones, 2003). Eine Langzeitstudie in vier Milchviehbetrieben in Lancashire, Großbritannien, beschreibt zwei Höhepunkte der *Campylobacter*-Ausscheidung: Frühling und Herbst (Stanley et al., 1998). Eine ältere, ebenfalls in Großbritannien entstandene Studie beschreibt allerdings einen saisonalen Höhepunkt im Sommer, ein Absinken der Ausscheidung thermophiler *Campylobacter* spp. im Winter und einen Wiederanstieg im Frühling (Robinson, 1982). Die periodische Ausscheidung thermophiler *Campylobacter* spp., wie sie von Stanley et al. (1998) für Lancashire beschrieben wurde, konnte zum Teil auch in der vorliegenden Untersuchung festgestellt werden. Da der Ausscheidungshöhepunkt im Frühling, ebenso wie in der Untersuchung von Stanley et al. (1998), mit der Abkalbezeit zusammenfällt, was für die Kühe einen Stressfaktor darstellt, kann angenommen werden, dass die detektierte Reduktion der *Campylobacter*-Ausscheidung u. a. auf diesen Faktor zurückzuführen ist.

Auffällig ist außerdem, betrachtet man die einzelnen Ergebnisse bezogen auf die unterschiedliche Wirtschaftsweise der Betriebe, dass die beiden anerkannten Biobetriebe bereits im Stall eine wesentlich niedrigere *Campylobacter*-Kontaminationsrate aufweisen, die sich bis zum Ende der Almsaison sogar auf 0 % reduziert. Während der Winterperiode im Stall ließe sich diese Beobachtung über eine andere Fütterungsweise erklären, da aber im Sommer weitgehend identische Haltungs- und Fütterungsbedingungen vorliegen, ist dieser Unterschied anhand der vorhandenen Daten nicht erklärbar. Weitere Studien, speziell ausgerichtet auf den Vergleich zwischen konventioneller Haltung und Biobetrieb, könnten hier Aufschluss bringen.

So reichen die vorliegenden Untersuchungszahlen bei weitem nicht, um Aussagen über die Ursachen dieses Rückgangs auf Bestandsebene treffen zu können. Festzuhalten ist allerdings, dass alle genannten Faktoren in unterschiedlicher Gewichtung zu dem beschriebenen Ergebnis beitragen.

Betrachtet man die mittels des Api-Campy®-Systems ermittelten *Campylobacter* spp., so ist festzustellen, dass in der Verlaufsuntersuchung zum überwiegenden Anteil *Campylobacter jejuni* (96 %) isoliert werden konnten, lediglich in einem einzigen Fall wurde *Campylobacter coli* gefunden. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten aus der

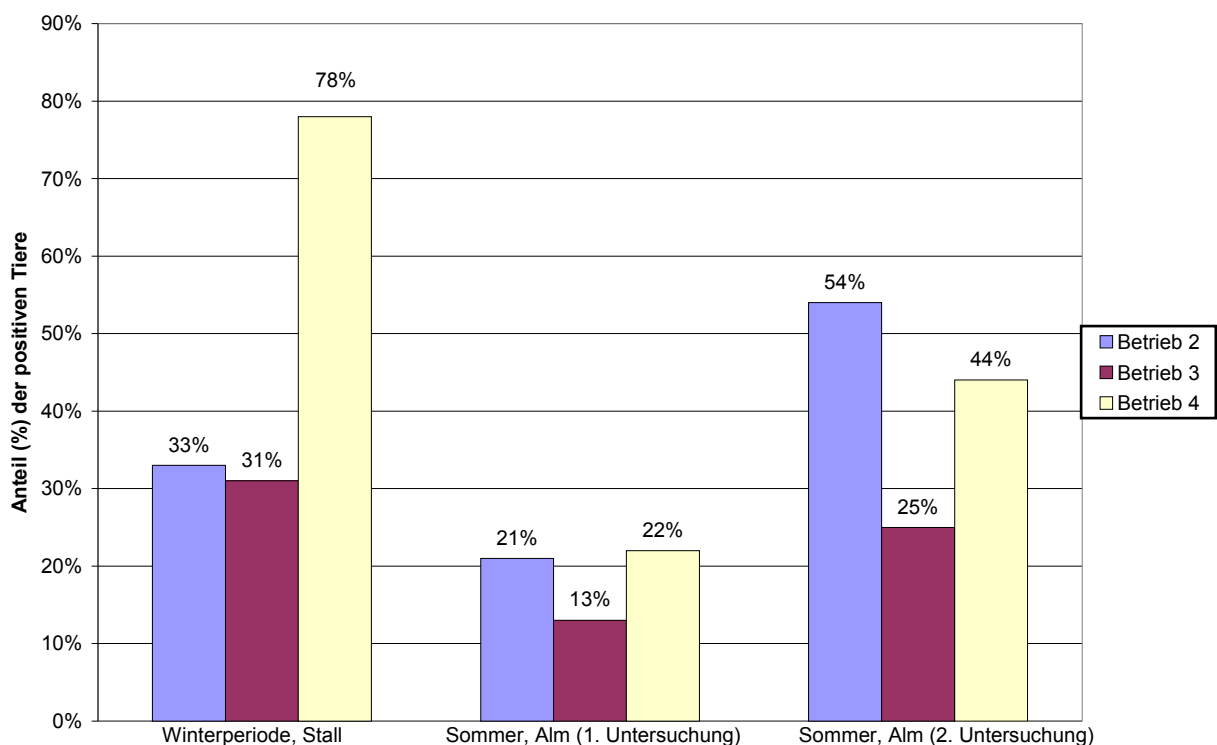
amerikanischen und kanadischen Literatur (Garcia et al., 1985, On et al., 1996, Wesley et al., 2000).

5.2.2 Verlaufsuntersuchung für Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

In Bezug auf die STEC-Ausscheidung im Kot zeigte sich für die drei in die Verlaufsuntersuchung einbezogenen Betriebe ein anderes Bild, als es bei den thermophilen *Campylobacter* spp. der Fall war:

Es ist zwar in allen Beständen nach der Älpung ein deutlicher Rückgang der STEC-Ausscheidung zu beobachten, allerdings steigt die Kontaminationsrate zum Ende der Almsaison wieder an, wobei in einem Bestand (Betrieb 2) die Kontaminationsrate der Winterperiode sogar weit überschritten wurde:

Abbildung 19: Verlaufsuntersuchung STEC (Rinderkotproben)



Das Absinken der STEC-Ausscheidungsrate nach der Älpung ließe sich auf die Fütterungsumstellung zwischen Stall- und Weidehaltung zurückführen (Kudva et al., 1997, Hovde et al., 1999). Der Anstieg zum Ende der Almsaison findet kein Pendant in

der Literatur, zumal zwischen der zweiten und der dritten Probenentnahme keinerlei bewusste Veränderungen im Fütterungsmanagement vorgenommen wurden. Bedacht werden muss zwar, dass die dritte Probenentnahme gegen Ende der Almsaison durchgeführt wurde, in einem Zeitraum, in dem der Aufwuchs bereits zurückging. Eine ausreichende Versorgung aller Tiere konnte aber zu dem Zeitpunkt der Probenentnahme noch gewährleistet werden. Als mögliche Erklärung des in allen drei Betrieben beobachteten Anstiegs gegen Ende der Almsaison könnte die bei STEC, ebenso wie bei thermophilen *Campylobacter* spp., beschriebenen intermittierenden Ausscheidung dienen (Zhao et al., 1995).

Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Wirtschaftsformen (konventionelle Haltung und anerkannter Biobetrieb) ist bei der Ausscheidung von STEC, anders als bei der Ausscheidung von thermophilen *Campylobacter* spp. nicht zu beobachten.

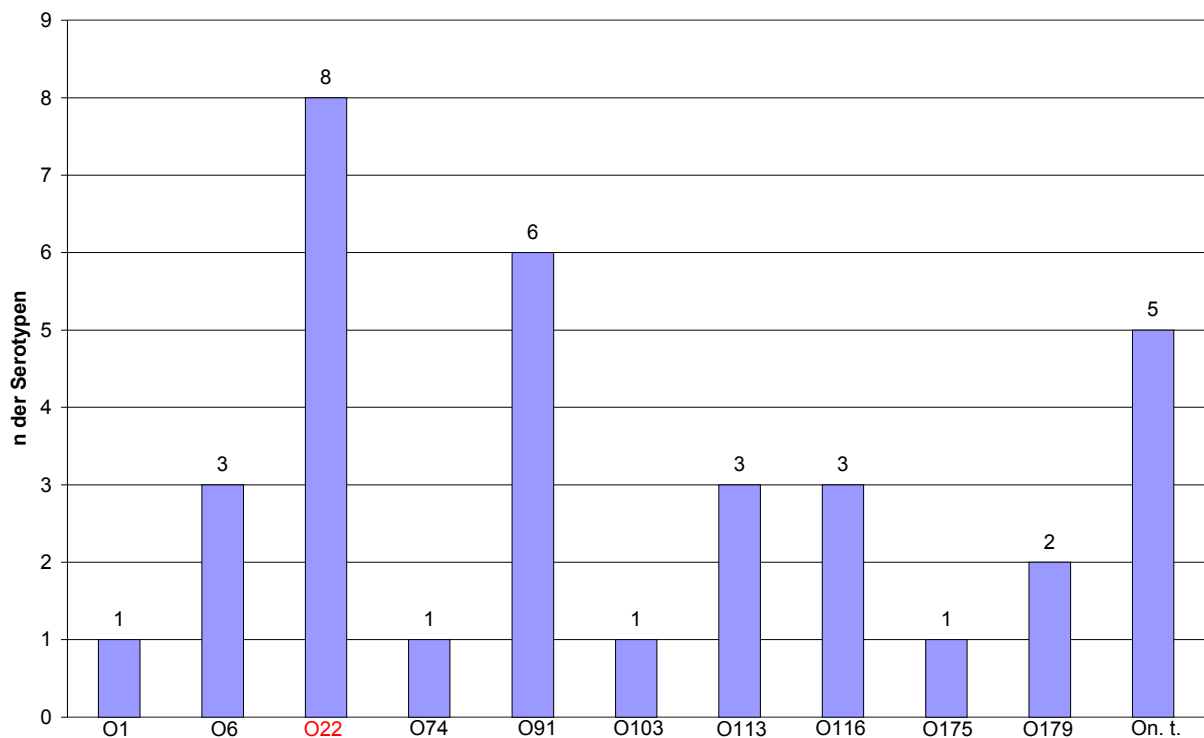
Nicht auszuschließen ist, dass der deutliche Anstieg der STEC-Ausscheidung bei Betrieb 2 auf eine Neuinfektion der Tiere mit STEC zurückzuführen ist. Eine „Stille Infektion“ mit einem „nichtstallspezifischen“ STEC-Stamm wird in der Regel nicht bemerkt, da sie in den meisten Fällen zu keinerlei sichtbarer Symptomatik bei den Tieren führt; als Infektionsquellen kämen die Tränke oder die Weide in Betracht (van Donkersgoed et al., 2001). Obwohl das Wasser des Bergbaches bei beiden Untersuchungen STEC-negativ war, kann die Tränke als Infektionsquelle nicht ausgeschlossen werden, da es sich bei allen Untersuchungen immer um „Momentaufnahmen“ handelt. Als eine weitere mögliche Infektionsquelle ist kontaminiertes Weidegras denkbar; der Kontakt zu anderen, „stallfremden“ Kühen konnte wegen einer entsprechenden Umzäunung des Weidegeländes in diesem Fall ausgeschlossen werden. Durch das Weidegelände führt ein Wanderweg, so dass zum einen die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass STEC über verschmutzte Wanderschuhe von anderen Weiden eingetragen wurde. Schuhe als Übertragungsquelle für thermophile *Campylobacter* spp. sind in der Literatur bereits beschrieben (Kazwala et al., 1990). Zum anderen aber kann auch darüber spekuliert werden, ob Hundekot der Auslöser einer Neuinfektion war. Da STEC auch bei Hunden zu finden ist (Gallien et al., 1994, Stöcker, 2002) und der Wanderweg, vor allem in den Sommerferien stark von Hundebesitzern frequentiert wurde, sollte diese Überlegung nicht völlig ausgeschlossen werden. Die Vermutung, dass es sich im Falle dieses

Betriebes um eine Neuinfektion handelt, wird dadurch gestützt, dass der überwiegende Anteil der detektierten Proben *stx2* positiv war. Eine Serotypisierung könnte hier zwar Aufschluss darüber bringen, ob alle Isolate dem gleichen Serotyp angehören. Für weiterführende epidemiologische Untersuchungen bietet sich beispielsweise die Pulsfeldgelelektrophorese an (Heir et al., 2001). Eine eindeutige Aussage über eine bestimmte Infektionsquelle ist allerdings auch bei Einsatz dieser Methode schwierig.

5.2.3 Auswertung der Serotypisierungsergebnisse

Insgesamt wurden 41 % (34) der STEC-Isolate aus Rinderkotproben sowie das Brauchwasserisolat serotypisiert; so konnten in den vier landwirtschaftlichen Betrieben 11 unterschiedliche Serotypen festgestellt werden. Allerdings wurden bei Tieren, die mehrmals beprobt wurden, zum überwiegenden Teil bei jeder Probenentnahme andere Serotypen ermittelt. Auch ein bestandsweise gehäuftes Auftreten eines Serotyps war nicht festzustellen.

Abbildung 20: Serotypisierungsergebnisse der STEC-Isolate



rote Schrift: u. a. als Auslöser von HUS in der Literatur zu finden (siehe unten)

Das Isolat, das bei einem Betrieb im Brauchwasser gefunden wurde, On.t.:H8, konnte in dem zugehörigen Bestand kein weiteres Mal gefunden werden; eine Kontamination

des Brauchwassers durch Abwässer oder Gülle aus dem betroffenen Betrieb ist somit eher unwahrscheinlich.

Zum Teil konnten aus den Rinderkotproben Serotypen isoliert werden, die bereits bei menschlichen EHEC-Erkrankungen diagnostiziert wurden, z. B. O22 (Bockemühl et al., 1990). Ein STEC-Isolat (O103:H-) besaß neben dem EHEC *hly*-Gen, das relativ häufig vertreten war, zusätzlich noch das *eae*-Gen. Stämme mit einer solchen Genausstattung (*stx*, *eae* und EHEC *hly*) weisen nach bisherigen Erkenntnissen die höchste Virulenz unter den STEC/EHEC auf (Bockemühl et al., 1998). Aber auch Stämme mit unvollständigem Virulenzmuster sind in der Lage, menschliche Erkrankungen auszulösen. Das *eae*-Gen wurde 1997 zwar bei 95,7 % der HUS-Fälle in Deutschland festgestellt, aber nur bei 65,5 % der EHEC-bedingten Enteritisfälle (Bockemühl et al., 1998). Zur Zeit lässt sich noch nicht eindeutig definieren, welche Kriterien einen STEC zum EHEC werden lassen; somit müssen alle in dieser Studie isolierten STEC als potentielle EHEC betrachtet werden (Lehmann et al., 2003). So liegt hier ein Gefährdungspotential vor, das nicht unterschätzt werden sollte, auch wenn der Prototyp des EHEC, O157:H7, in dieser Untersuchung nicht gefunden werden konnte.

5.3 Kontamination von auf Almen produzierten Lebensmitteln mit Shiga Toxin-bildenden *E. coli* und thermophilen *Campylobacter species*

In der vorliegenden Untersuchung konnte aus keiner der 207 Einzelgemelks- und 2 Tankmilchproben STEC isoliert werden; eine der 10 entnommenen Lebensmittelproben, deren Spektrum von Butter über Weichkäse bis hin zu gereiftem Hartkäse reichte, war in der Real-Time-PCR-Untersuchung STEC-positiv. Allerdings war in diesem Fall eine Keimisolierung mittels Kolonieblot-Hybridisierung nicht möglich. Aus lebensmittelrechtlicher Sicht wäre eine Beanstandung dieser Probe als gesundheitsgefährdend nach § 8 LMBG zumindest problematisch, da gemäß Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG eine Keimisolierung vorgeschrieben ist. Generell gilt zur Zeit noch, dass die Beanstandung eines verzehrfertigen Lebensmittels aufgrund eines STEC-Nachweises nur möglich ist, wenn auch der kulturelle Nachweis des Keimes erfolgt ist. Aus einer Brauchwasserversorgung, die in den einzelnen Betrieben für die Tränkung der Tiere herangezogen wird, wurde

ebenfalls in einem Fall STEC isoliert. Diese Quelle wird inzwischen nicht mehr zur Versorgung der Tiere eingesetzt.

Eine Einzelgemelksprobe auf einer Alpe erwies sich als *Campylobacter*-positiv. Allerdings war eine weitere Probe dieses Tieres bei der zweiten Untersuchung negativ. In Lebensmitteln und Proben der Wasserversorgung konnten keine thermophile *Campylobacter* spp. isoliert werden.

Zu betonen ist dabei, dass die Einzelgemelksproben bei der Status-quo-Untersuchung im Stall nach einer kurzen Reinigung der Zitzen mit einem trockenen Tuch entnommen wurden, bei den Untersuchungen auf den Almen vor dem Ansatz des Melkzeugs bzw. aus den Melkeimern nach Ende des Melkens bei jeder einzelnen Kuh. Es kam keinerlei Desinfektionsmittel zum Einsatz, wie es eigentlich nach GVP üblich wäre. So sollte die natürliche Kontaminationssituation während eines normalen Melkaktes möglichst originalgetreu nachempfunden werden.

Des Weiteren muss bei Interpretation der Ergebnisse und im Rahmen der Risikobewertung bedacht werden, dass die Probenentnahme für die Untersuchung auf thermophile *Campylobacter* spp. direkt vom Tier in eine Anreicherungsbouillon erfolgte. Normalerweise können thermophile *Campylobacter* spp. nach einer Studie mit artifiziell kontaminierter Rohmilch in dieser Matrix, abhängig von der Begleitflora und Lagerungstemperatur, zwischen 8 und 24 Stunden überleben. Bei einer Lagerungstemperatur zwischen 6° C und max. 8° C, die nach Anlage 3, Nr. 5 MilchV vorgeschrieben ist, waren nach 8 Stunden keine thermophilen *Campylobacter* spp. nachweisbar, wobei auch die Möglichkeit nicht auszuschließen ist, dass ein starkes Wachstum der Begleitflora eine Isolierung der als äußerst empfindlich geltenden *Campylobacter* spp. verhinderte (Stiller, 1998). Geht man davon aus, dass in den meisten Betrieben am Morgen zwischen 5 Uhr und 6 Uhr gemolken wird und die meisten Wanderer für eine Brotzeit am späten Vormittag oder Mittag die Almen erreichen, ist diese experimentell ermittelte Überlebensgrenze häufig überschritten. Ähnliches gilt für Milch im Falle der Frühstücksbewirtung, da es sich dabei meist aus logistischen Gründen um die Milch vom Abend zuvor handelt. Insgesamt betrachtet, ist das Risiko einer menschlichen Infektion unter den genannten Bedingungen zwar als gering zu erachten, kann aber nicht ausgeschlossen werden; so gelingt in der amtlichen Lebensmittelüberwachung immer wieder die Isolierung thermophiler

Campylobacter spp. aus Vorzugsmilch und Rohmilch ab Hof. Nach einer Statistik des RKI waren 2002 von 378 auf thermophile *Campylobacter* spp. untersuchten Vorzugsmilchproben eine (0,26 %), bei 138 untersuchten Rohmilch-ab-Hof-Proben zwei (1,45 %) positiv (Hartung, 2003); ähnliche Isolierungsraten nennt auch das LGL Nordbayern, Erlangen, das im Zeitraum von 2000 bis 2003 in 2481 untersuchten Rohmilchproben nur in einem einzigen Fall (0,04 %) *Campylobacter jejuni* nachgewiesen hat (Weber et al., 2004).

Die in der vorliegenden Studie ermittelte Isolierungsrate von 0,48 % (eine positive Probe von insgesamt 209 untersuchten Einzel- und Tankmilchproben) zeigt somit, dass die Kontamination der Rohmilch unter den einfachen technischen und hygienischen Bedingungen der Almen nicht höher ausfällt als bei vergleichbaren Untersuchungen in Talbetrieben. In internationalen Studien liegt die Isolierungsrate für thermophile *Campylobacter* spp. aus Rohmilch zwischen 0,4 % (McManus und Lanier, 1987) und 12,3 % (Rohrbach et al., 1992) in den USA und zwischen 0,47 % (Steele et al., 1997) und 1,2 % (Davidson et al., 1989) in Kanada.

Die meisten Experten gehen davon aus, dass dem Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. in Rohmilch eine nachträgliche Kontamination dieses Lebensmittels vor allem mit Rinderkot vorangeht, also vermeidbare oder aber auch unvermeidbare Hygienefehler während oder nach dem Melken aufgetreten sind (Jayarao und Henning, 2001; Stanley und Jones, 2003). Über eine mögliche intramammäre Kontamination von Rohmilch, vor allem in Bezug auf thermophile *Campylobacter* spp., in Zusammenhang mit einer subklinischen oder auch klinischen Mastitis liegen nur wenige Erkenntnisse vor (Lander und Gill, 1980, Orr et al., 1995, Mäde et al., 2004). Sollten sich aber Berichte über solche Zusammenhänge häufen, wäre eine erneute Beurteilung der Verzehrtauglichkeit von Rohmilch anzustreben.

Insgesamt wurden von ca. 4.500 geälpten Milchkühen in Bayern 75 Tiere bei der ersten Untersuchung und 72 bei der zweiten Untersuchung im Sommer berücksichtigt. Das entspricht einem Prozentsatz von 1,7 % bzw. 1,6 % der geälpten Kühe. Eine statistische Auswertung und eine darauf basierende Risikoabschätzung für die Gesamtheit der Tiere und die erzeugten Lebensmittel auf den über 100 Almen in Bayern wäre zwar mit den vorhandenen Zahlen möglich, aber sicherlich nicht sinnvoll.

Das hat vor allem zwei Gründe:

- Die Teilnahme der einzelnen Höfe an dieser Untersuchung erfolgte freiwillig. Diese Tatsache allein führt zu einer gewissen positiven Selektion von Betrieben, die vorbildlich und verantwortungsbewusst geführt werden und deren Inhaber auch bereit sind, auftretende Probleme offensiv anzugehen und zu beseitigen. Ein Rückschluss von diesen Höfen auf die Gesamtheit aller Almbetriebe ist nach eigenen Erfahrungen, die auch von den beteiligten Veterinärämtern bestätigt wurden, nicht möglich, und würde voraussichtlich zu einem zu gering angesetzten Risiko führen.
- Bei den Untersuchungen handelt es sich jeweils um Momentaufnahmen, die den Status des Betriebes zum Zeitpunkt der Untersuchung widerspiegeln. Beispielsweise in Bezug auf die Wasserversorgung, deren bakterieller Status vor allem wetterabhängig ist, müssen Aussagen zur Gesamtsituation auf den Almen mit großer Vorsicht getroffen werden.

Abschließend lässt sich ein Fazit aus diesen Untersuchungen ziehen: Es ist bei entsprechender hygienischer Arbeitsweise auch unter den wenig technisierten Arbeitsbedingungen, die man auf den Almen vorfindet, und bei Einsatz von angeleitetem Hilfspersonal, das keine landwirtschaftliche oder lebensmitteltechnische Ausbildung hat, wie es bei den Sennerinnen in Berchtesgaden und Traunstein seit jeher üblich ist, möglich, STEC- und *Campylobacter*-freie Lebensmittel, also Rohmilch, Butter und Rohmilchkäse, zu erzeugen. Ein Restrisiko für die Kontamination der Rohmilch oder der Rohmilchprodukte mit den genannten pathogenen Bakterien kann, auch das beweist diese Arbeit, selbst bei korrekter und sauberer Arbeitsweise allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Punkt sollte aber in einer Diskussion über die Gefahren der Rohmilch und daraus erzeugter Lebensmittel nicht außer Acht gelassen werden: In der vorliegenden Arbeit war eine Isolierung von STEC und thermophilen *Campylobacter* spp. aus Milch und Lebensmitteln in jeweils einem Fall erfolgreich. Es gelang aber der Nachweis sowohl von thermophilen *Campylobacter* spp. wie auch von STEC aus einer größeren Anzahl von Kotproben, sowohl im Stall als auch auf der Alm. So muss man aufgrund dieses Ergebnisses davon ausgehen, dass ein Gefährdungspotential, vor allem für

Kinder, weniger im Verzehr der Lebensmittel, sondern eher im Umgang mit den Tieren besteht, überwiegend dann, wenn von Seiten der Erziehungsberechtigten nicht für ausreichende Hygienemaßnahmen, beispielsweise Händewaschen, gesorgt wird. Die Übertragung von thermophilen *Campylobacter* spp. ausschließlich durch Tierkontakt wird vor allem aus den USA in Zusammenhang mit der Brandkennzeichnung und dem intensiven Kontakt mit Kälbern beschrieben (Heryford und Seys, 2003). In vielen anderen Fallberichten aus den USA, Kanada und Deutschland gilt der Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Rohmilch und einer *Campylobacter*- bzw. EHEC-Erkrankung als sehr wahrscheinlich (Finch und Blake, 1985, Bockemühl et al., 1990, Allerberger et al. 2001). Häufig sind Schulklassen nach einem Besuch eines Bauernhofes mit anschließendem Konsum von Rohmilch betroffen (CDC, 1986, Brockmann et al., 2000). Der Erregernachweis gelingt der Lebensmittelüberwachung in der Mehrzahl der Fälle nur aus Rinderkot, nicht aber aus der Rohmilch (Weber et al., 2004). Das kann zum einen daran liegen, dass Proben der konsumierten Rohmilch nach zwei bis drei Tagen in den seltensten Fällen noch zur Verfügung stehen und nur noch Vergleichsproben entnommen werden können. Aus Deutschland existiert lediglich ein Fallbericht, bei dem nach einem Ausbruch einer *Campylobacter*iose unter Schulkindern nach einem Bauernhofbesuch auch in der Rohmilch thermophile *Campylobacter* spp. nachweisbar waren (Thurm et al., 2000).

Ähnliches wie für thermophile *Campylobacter* spp. gilt auch für EHEC- bzw. HUS-Erkrankungen. Nach Surveillancestudien des LGL aus den Jahren 1996 bis 2002 stellen zwar kontaminierte Lebensmittel insgesamt nach wie vor den häufigsten bekannten Übertragungsweg dar. Der Konsum von Rohmilch/Rohmilchprodukten wurde hierbei bei 24 % der Erkrankungsfälle als mögliche Infektionsquelle ermittelt, rohes Fleisch in 14 % und der mit Gülle, Jauche oder Festmist gedüngte Garten in 12 % der Fälle. Kontakt mit Wiederkäuern oder deren Kot wird allerdings bei 37 % der Fälle als mögliche Ursache genannt, also fast ebenso häufig wie rohe Lebensmittel tierischen Ursprungs insgesamt (Morlock, 2002).

Somit liegt die Vermutung nahe, dass sich vor allem Kinder nicht über den Verzehr von rohen Lebensmitteln, sondern über den Kontakt mit Tieren aufgrund eines mangelnden Hygienebewusstseins infizieren (Orth et al., 2004). Gerade von Kälbern, die ein beliebtes Streichelobjekt darstellen, weiß man, dass diese vor allem bei Durchfallerkrankungen u. a. STEC in sehr hohen Konzentrationen im Kot ausscheiden.

Natürlich darf bei dieser Diskussion nicht außer Acht gelassen werden, dass der Nachweis beider Erreger aus Lebensmitteln ungleich schwieriger ist als aus Rinderkotproben, schon aufgrund dessen, dass meistens nicht mehr die Original-, sondern nur noch Vergleichsproben zur Verfügung stehen; ebenso ist die Erregeranzahl und die Überlebensfähigkeit beider Bakterien in Stuhl- und Kotproben, ihrem natürlichen Reservoir, zumeist wesentlich höher als in Lebensmitteln.

Um im Sinne des gesundheitlichen Verbraucherschutzes das Gefahrenpotential durch STEC und thermophile *Campylobacter* spp. in rohen Lebensmitteln so gering wie möglich zu halten, sollte auf den Almen für ein gutes Hygienemanagement gesorgt sein. Die hygienische Handhabung von Rohmilch und Rohmilchkäse ließe sich über eine regelmäßige Untersuchung von Tankmilch- und Käseproben auf EHEC und thermophile *Campylobacter* spp. gewährleisten. Auch wenn es sich bei solchen Probenentnahmen natürlich nur um „Momentaufnahmen“ handelt, lässt sich doch eine Aussage über den Hygienestatus in den einzelnen Betrieben treffen. Nach den Vorschriften des neuen Produkthaftungsgesetzes gilt auch für den in der Primärproduktion tätigen Landwirt im Schadensfall die Beweisspflicht. Eine regelmäßige Untersuchung der Tankmilch und evtl. der hergestellten Produkte minimiert auch für den Landwirt das Risiko eines Schadensfalles und damit die Gefahr umfassender Schadensersatzleistungen. Je nachdem, welche Lebensmittel abgegeben werden, wäre eine einmalige (im Falle der Produktion von Hartkäse mit einer Reifungsdauer von mehr als vier Wochen) oder aber eine monatliche Probenentnahme (im Falle der Abgabe von Weichkäse oder frischer Rohmilch), wie auch für Vorzugsmilchbetriebe nach Anlage 9, Nr. 3, MilchV im Tal vorgeschrieben, zu überlegen.

Da die Umsetzung einer solchen Vorschrift allerdings für die Kontrollbehörden mit großem personellem Aufwand verbunden wäre, da einige Veterinärämter im Alpenraum über 50 Alpen bzw. Almen zu betreuen haben, wäre es eine sinnvolle Überlegung, die Untersuchungspflicht in die Hände der Landwirte/Senner(innen) zu legen, wie es für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* bei Rohmilchkäse bereits geschehen ist (BgVV 2000).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Thermophile *Campylobacter* spp. und Enterohämorrhagische *E. coli* stehen in Deutschland, gemeinsam mit *Salmonella* spp. und *Yersinia* spp., an der Spitze der bakteriellen Enteritiserreger. Betrachtet man die Entwicklung in anderen europäischen Ländern sowie in den USA und Kanada, so kann man davon ausgehen, dass sich dieser Trend in den nächsten Jahren fortsetzen wird.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zum einen zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß auf Almen produzierte, naturbelassene Lebensmittel mit Shiga Toxinbildenden *E. coli* und thermophilen *Campylobacter* spp. kontaminiert sind, denn die Almwirtschaft spielt in den bayerischen Alpen nach wie vor eine bedeutende Rolle. Neben diesem Aspekt des gesundheitlichen Verbraucherschutzes sollten Daten darüber gewonnen werden, auf welche Weise sich die Ausscheidung beider Bakterien mit dem Kot durch die Älpung verändert.

Die Untersuchungen begannen im Februar 2004 und endeten mit dem Almabtrieb im September 2004. In diesem Zeitraum fanden die Probenentnahmen einmal im Winter während der Stallsaison und zweimal während des Almsommers statt. Es wurden Proben von Rinderkot, Milch, auf den Almen produzierten Lebensmitteln, wie Butter und unterschiedliche Käsesorten, sowie Proben der Wasserversorgung in vier verschiedenen bayerischen Betrieben entnommen und mittels klassisch kulturtechnischer und molekularbiologischer Methoden auf STEC und thermophile *Campylobacter* spp. untersucht.

Eine nennenswerte Abnahme der STEC-Ausscheidung mit dem Kot war während der Almsaison nicht festzustellen. Die Nachweisrate von thermophilen *Campylobacter* spp. ging allerdings deutlich zurück. Eine der 203 gewonnenen Milchproben (0,5 %) erwies sich als *Campylobacter*-positiv, in einer Quellwasserprobe und in einem halbfesten Schnittkäse jeweils eines Betriebes konnten STEC festgestellt werden, wobei eine Keimisolierung aus der Käseprobe allerdings nicht möglich war.

7 SUMMARY

Detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* and thermophilic *Campylobacter* species in cattle and natural products on alpine pasture

In Germany thermophilic *Campylobacter* spp. and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are - apart from *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp. - the most frequent bacterial sources of human gastroenteritis. Analyzing the development in other European countries as well as in the USA and Canada, one can presume that in near future thermophilic *Campylobacter* spp. will be at the top of the national statistics of food poisoning.

The objective of this study was a possible STEC or thermophilic *Campylobacter* spp. contamination of natural food produced on alpine pastures, as in Bavarian Alps the food production on alpine pastures is still of great importance. In addition to this aspect of consumer's health protection, it was on the other hand the intention to collect knowledge concerning a possible change of STEC and thermophilic *Campylobacter* spp. excretion between winter and summer time.

The studies started in February 2004 and ended in September 2004 with driving down the cattle from alpine pastures. In this period samples were collected: once at farms in winter and twice on alpine pastures in summer. Samples of cattle faeces, of natural products like milk, cheese and butter and of water supply of four different Bavarian farms were collected and examined with classical culture-technical microbiological and molecularbiological methods.

There was no appreciable change in the detection rate of STEC excretion between winter and summer period, but it is possible to state that thermophilic *Campylobacter* spp. excretion seems to go down clearly in summer. Thermophilic *Campylobacter* spp. were detected in one of 203 milk samples (0,5 %). STEC were determined in one sample of spring water and in one of natural cheese.

8 ANHANG

8.1 Anhang zu „Material und Methoden“

8.1.1 Allgemeine Materialien

- *Materialien für die Probenentnahme:*

- Rektalisierungshandschuhe clinhand® ultravet 1 × Handschuhe, 50 Stück, REF 5.001.808 (Samco clinhand GmbH, Germany)
- Falcon® 50 ml Polystyrene Conical Tubes, 30 × 115 mm style 25/Pack, Nr. 352073 (Becton Dickinson Labware, USA)
- Folienstift, OHP-CD PLUS 1523 permanent (Faber-Castell, Germany)
- edding 3000, permanent marker, 1,5 – 3 mm (edding, Germany)

- *Pipetten:*

- eppendorf Reference 10 µl (eppendorf, Germany)
- eppendorf Reference 100 µl (eppendorf, Germany)
- eppendorf Reference 1000 µl (eppendorf, Germany)
- eppendorf Multipipette® plus (eppendorf, Germany)
- Transferpipette®-8; 5 – 50 µl (Brand, Germany)
- Transferpipette®-8; 0,5 – 10 µl (Brand, Germany)

- *Pipettenspitzen (eppendorf, Deutschland):*

- ep T.I.P.S filter PCR clean, Nr. 0030 007.040, 10 µl
- ep T.I.P.S filter PCR clean, Nr. 0030 077.067, 100 µl
- ep T.I.P.S filter PCR clean, Nr. 0030 077.105, 1000 µl
- ep T.I.P.S reloads 100 µl
- ep T.I.P.S reloads 1000 µl
- eppendorf Compitips plus, Nr. 0030 069.463, 10 ml
- eppendorf Compitips plus, Nr. 0030 069.455, 5 ml lang

- *Mikroskop, Objektträger und Zubehör:*

- Lichtmikroskop Leica DMLP (Leica, Germany)
- Objektträger 50 St. No. 10.000 00, ca. 76 × 26 × 1 mm (Superior Marienfeld)
- Deckgläser 100 St. No. 1, ca. 24 × 33 mm (Superior Marienfeld)
- Paraffinöl 125 ml REF 70100 (bioMèreux® sa, France)

- *PCR-Zubehör:*

- MicroAmp Reaction tubes N 801-0838 (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA)
- MicroAmp Capes N 801-0535 (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA)
- eppendorf safe-lock-tubes, 1,5 ml, 1000 St. Nr. 0030 121.848 (eppendorf, Germany)
- eppendorf safe-lock-tubes, 2 ml, 1000 St. Nr. 0030 120.094 (eppendorf, Germany)

- *Material für Wasserproben:*

- Filterpumpanlage 16612 (Sartorius Membranfilter GmbH Göttingen)
- Glasflasche 5000 ml Duran (Schott, Germany)
- Cellulose-Nitrate-Filter, 0,45 µm, 1000 St., Nr. 13806--50----ACN (Sartorius AG, Germany)

- *Sonstiges:*

- Pinzetten:
HAUPTNER 86, Stainless III (Hauptner, Germany)
- Handschuhe:
SAFESKIN SATIN PLUS powder-free latex exam gloves, Size M, REF SP2330E (Kimberly-Clark, USA)
SAFESKIN PURPLE NITRILE powder-free purple nitrile exam gloves, Size M, REF 52002M (Kimberly-Clark, USA)

- Messbecher/-zylinder:
 Messzylinder 100 : 1 ml, +/- 0,5 ml Duran, Nr. 98.07 (Brand Eterna, Germany)
 Messzylinder 500 : 10 ml, in 20° C (Hirschmann EM TECHCOLOR, Germany)
 Messbecher 400 ml Boro 3.3 (Germany)

8.1.2 Materialien für Anzucht und Bearbeitung von thermophilen *Campylobacter species*

- *Anreicherung und Anzucht:*

- modifizierte Preston-Bouillon (Angaben für 500 ml Bouillon):
 - Campylobacter Agar Base, Code CM689
 - Campylobacter Selective Supplement (Preston), Code SR117
 - Campylobacter Growth Supplement, Code SR84
 - Lysed Horse Blood, Code SR48
(Oxoid, Great Britain)
- Blutagar-Platten, Blood Agar Base No.2, Code CM271 (Oxoid, Great Britain)
- Skirrow-Agarplatten:
 Blut-Agar-Basis No.2, Code CM271
 lysiertes Pferdeblut 5 %ig, Code SR48
 Campylobacter Selektiv Supplement, Code SR69 (für 500 ml Medium):
 5 mg Vancomycin
 2,5 mg Trimethoprim
 1250 IU Polymyxin B
 (Oxoid, Great Britain)
- Filter, Minisart® 0.65 µm, Sterile-EO, Nr. 16569 (Sartorius AG, Germany)
- Spritzen, Syringes 100 ml (Becton Dickinson Labware, USA)
- CO₂-Brutschrank Hera plus, 42° C (Heraeus Instruments, Germany)

- Brutraum, 37° C
- *ELFA (Enzyme-linked fluorescence Immunoassay)- Untersuchung:*
- Hettich Zentrifuge EBA 12 (Hettich, Germany)
 - Mini-VIDAS® -Gerät (bioMérieux sa, France)
 - VIDAS Campy Testkit REF 20100 (bioMérieux sa, France)
- *PCR-Ansatz:*
- PBS-Puffer (pH = 7,5):
 - 8,5 g Natriumchlorid, BDH AnalaR®, 58.44 g/mol, Prod. 102415K, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
 - 1,14 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Nr. 1.06580.0500, 500 g (Merck KGaA, Germany)
 - 0,5 g Kaliumdihydrogenphosphat Nr. 1.04873.0250, 250 g (Merck KGaA, Germany)
 - Aqua dest. ad 1000 ml
 - GENESpin for isolation of high-quality DNA from food, Cat. no.: 5224400605 (GeneScan Analytics GmbH, Germany)
 - QIAamp DNA Stool Mini Kit® (QIAGEN GmbH, Germany)
 - Ethanol 99.7 – 100 % v/v, BDH AnalaR®, Prod. 10107 (VWR International Ltd., Great Britain)
 - Schüttler Heidolph REAX top (Heidolph, Germany)
 - eppendorf Thermomixer comfort (eppendorf, Germany)
 - Tischzentrifuge Mikro 22R (Hettich, Germany)
 - Sterilbank Hera Safe (Heraeus Instruments GmbH Germany)
 - Kühlschranks Bosch economic cooler (Bosch, Germany)
 - Micro 7 Tischzentrifuge (Fisher Scientific)
- *MasterMix:*
- HotStarTaq® Master Mix Kit 1000 U, Cat. No. 203445 (QIAGEN GmbH, Germany)

- Primer pg3, Nr. 19-5513-2/2, und pg50, Nr. 19-5513-1/2 (MWG-Biotech AG, Germany)
- Tischzentrifuge Costar® (neoLab®, Germany)

- *PCR:*

- Thermocycler Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA)

- *Gel-Herstellung:*

- peqGOLD Universal Agarose, 500 g, Nr. 35-1020 (peqlab, Germany)
- Analysenwaage KERN 474 max. 620 g, min. 0,5 g, e = 0,1 g, d = 0,01 g (KERN, Germany)
- Mikrowelle Micro 750 W (Whirlpool)
- Vortex Mixer 7-2020 (neoLab®, Germany)
- TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA), Stammlösung 5 × TBE
54,0 g Tris-Base
27,5 g Borsäure
3,72 g EDTA-Na₂
Aqua dest. ad 1000 ml
Gebrauchslösung: 1 × TBE (1 Teil Stammlösung und 4 Teile Aqua dest.)
- Gel-Kammer B2 12 × 14 cm (peqlab Biotechnologie GmbH, Germany)
- Kämmen 20 Well, 1,5 mm, Nr. 40-1214-20D (peqlab Biotechnologie GmbH, Germany)
- Kämmen 16 Well, 1,5 mm, Nr. 40-1214-16D (peqlab Biotechnologie GmbH, Germany)
- Kämmen 12 Well, 1,5 mm, Nr. 40-1214-12D (peqlab Biotechnologie GmbH, Germany)

- *Elektrophorese:*

- Molekulargewichtsmarker pUC 8, 0,5 mg DNA/ml (Fermentas MBI, Germany)
- Elektrophorese-Kammer OWI Separations System (peqlab Biotechnologie GmbH, Germany)
- Stromquelle Consort E143 (peqlab Biotechnologie GmbH, Germany)

- *Färbung und Auswertung:*

- Ethidiumbromid-Lösung, 10 mg/ml Art. 2218.1 (Roth, Germany)
- INTAS[®] Duo-Store (INTAS, Germany)
 - Kamera
 - Tastenpad
 - Steuerungsteil des Duo-Systems
 - Video Graphic Printer UP-890CE
 - Monitor
 - UV-Tisch
 - Schutzgehäuse

- *Biochemische Differenzierung:*

- Dryspot[®] Campylobacter Test (Oxoid, Great Britain)
- Api[®] Campy, REF 20800 (bioMérieux sa, France)
- Identifizierungssoftware Api V0.2 (Oxoid, Great Britain)

8.1.3 PCR für thermophile *Campylobacter* species:

Für den Thermocycler (Perkin Elmer 9600) wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

- Initiale Denaturierung: 95° C für 15 Minuten

- Zyklusphase: 40-maliges Durchlaufen des folgenden Zyklus (Denaturierung, Anlagerung, Synthese):

42° C für jeweils 1 Minute

72° C für jeweils 30 Sekunden

- Abschließender Syntheseschritt: 72° C für 5 Minuten

- Abkühlung auf: 4° C

8.1.4 Materialien für Anzucht und Bearbeitung von Shiga Toxin-bildenden *E. coli*

- *Anreicherung und Anzucht:*

- m-TSB-Bouillon (Angaben für 1000 ml Bouillon):

30,0 g m-TSB

1,5 g Gallensalze Nr. 3

1,5 g Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)

Aqua dest. ad 1000 ml

Zubereitung erfolgt durch die Nährbodenküche des LGL

- Novobiocin-Lösung ($\rho = 20 \text{ mg/ml}^3$) (SIGMA®-ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany)

- ENDO-Agarplatten (für 1000 ml):

10,0 g Peptone

2,5 g Dikaliumhydrogenphosphat

10,0 g Lactose

3,3 g Natriumsulfit, wasserfrei

0,3 g Pararosanilin (Fuchsin)

12,5 g Agar-Agar

Aqua dest. ad 1000 ml

Art. Nr. 1.04044.0500/5000, 5 kg (Merck KGaA, Darmstadt),

Zubereitung durch die Nährbodenküche des LGL

- Mueller-Hinton-Agarplatten (für 1000 ml):

300,0 g dehydrierte Fleischextraktlösung

17,5 g Casein-Hydrolysat

1,5 g Stärke

17,0 g Agar

Aqua dest. ad 1000 ml

Code: CM337 (Oxoid, Great Britain),

Zubereitung durch die Nährbodenküche des LGL

- Lactose-TTC-Agar mit Tergitol® 7 (für 1000 ml):
 - 20,0 g Lactose
 - 10,0 g Pepton
 - 6,0 g Hefeextrakt
 - 5,0 g Fleischextrakt
 - 0,05 g Bromthymolblau
 - 0,1 g Tergitol® 7
 - 12,7 g Agar-Agar
 - 0,025 g TTC

Aqua dest. ad 1000 ml

Art. Nr. 1.07680.0500, 500 g (Merck KGaA, Darmstadt),

Zubereitung durch die Nährbodenküche des LGL

- *PCR-Ansatz:*

- Isotonische Kochsalzlösung Fresenius 250 ml (Fresenius Kabi Deutschland GmbH)
- AmpuWa®, Wasser, DNase-frei, 2 ml (Fresenius Kabi Deutschland GmbH)
- Eppendorf Thermomixer comfort (eppendorf, Germany)
- Tischzentrifuge 5417 R (eppendorf, Germany)

- *MasterMix:*

- HotStarTaq® DNA Polymerase, Cat. Nr. 203203 (QIAGEN GmbH, Germany):
 - HotStarTaq® DNA Polymerase, 250 units
 - PCR Buffer 10 ×, 1,2 ml
 - MgCl₂, 25 mMol, 1,2 ml
- Primer KS7, KS8, LP43, LP44
- GeneAmp® dNTP-Mix, Part.-No.: N808-0007 (Roche Diagnostics)

10 mMol dATP, dCTP, dGTP, dTTP

- *PCR:*

- Thermocycler Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA)

- *Gel-Herstellung:*

- TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA), Stammlösung 5 × TBE
54,0 g Tris-Base (TRIZMA® Base 1kg, T-8524, SIGMA®-ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany)
27,5 g Borsäure
3,72 g EDTA-Na₂, Art.-Nr. 8043.1, 250 g (Roth, Germany)
Aqua dest. ad 1000 ml
Gebrauchslösung: 1 × TBE (1 Teil Stammlösung und 4 Teile Aqua dest.)
- peqGOLD Universal Agarose, 500 g, Nr. 35-1020 (peqlab Biotechnologie, Germany)
- Mikrowelle Micro-Chef FM B935 (Moulinex, Germany)
- Kämme 20 Well (Bio-RAD, Germany)
- Gel-Kammer (Bio-RAD, Germany)

- *Elektrophorese:*

- Gel-Loading-Puffer:
62,5 mg Bromphenolblau
62,5 mg Xylencyanol
62,5 mg Ficoll (Typ 400)
Aqua dest. ad 25 ml
- Molekulargewichtsmarker pUC 8, 0,5 mg DNA/m, SM0301 (Fermentas MBI)
- Elektrophoresekammer SUB-CELL® (Bio-RAD, Germany)
- Stromquelle POWER PAC 300 (Bio-RAD, Germany)

- *Färbung und Auswertung:*

- Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml, Art. 2218.1 (Roth, Germany)
- UV-Kammer mit integrierter Kamera Gel-Doc 1000 (Bio-RAD, Germany)
- Computer mit Auswertungssoftware Molecular Analyst 1.5 (Bio-RAD, Germany)
- Drucker Mitsubishi Video Copy Processor PG 6 DE (Mitsubishi, Japan)

- *Real-Time-PCR:*

- Isotonische Kochsalzlösung Fresenius 250 ml (Fresenius Kabi Deutschland GmbH)
- AmpuWa[®], Wasser, DNase-frei, 2 ml (Fresenius Kabi Deutschland GmbH)
- Eppendorf Thermomixer comfort (eppendorf, Germany)
- Tischzentrifuge 5417 R (eppendorf, Germany)

- *MasterMix für die Real-Time-PCR:*

- Primer (Sequenzen siehe 8.1.5)
- Sonden (Sequenzen siehe 8.1.5.)
- LightCycler[®] Fast Start DNA Master Hybridization Probes, Nr. 2239272 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH, Germany)
- LightCycler[®] Capillares 20 µl, Nr. 11909339001 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH, Germany)
- LightCycler[®] Carousel Centrifuge (Roche Diagnostics Mannheim GmbH, Germany)

- *Bearbeitung und Auswertung:*

- LightCycler[®] Nr. 1403282 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH)

- Computer, HP Vectra VL, mit Auswertungssoftware LC Software Version 3.5 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH)

- *Kolonieblot-DNA-Hybridisierung:*
 - GS Gene Linker® UV Chamber (BIO RAD Laboratories, CA)
 - Schüttler, beheizt:
Inkubator 1000 und Unimax 1010 (Heidolph, Germany)
 - Schüttler, unbeheizt:
Promax 1020 (Heidolph, Germany)
 - Hybridisierungsöfen:
Hybridisierungsöfen (Heraeus Instruments)
Hybridisierungsöfen (Kendro Laboratory Products)
 - Hybridisierungsgefäße mit Schraubverschluß GL45 (Schott, Germany)
 - Flaschen (Schott, Germany):
1000 ml Duran
10.000 ml Duran
 - Erlenmeyer-Kolben (Schott, Germany):
500 ml Duran
100 ml Duran
 - Biodyne A® - Transfermembranen, removal rating: 1,2 µl,
ø 0,082 m (BioSupport Division Pall GmbH Filtrationstechnik)
 - Gel-Blotting Papiere Art. 4928.1, 100 Stck., 580 × 600 mm (Roth, Germany)
 - DIG Easy Hyb®, 500 ml, Cat.-No.: 1603558 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH)
 - DIG Wash and Block Puffer Set, Cat.-No.: 1585762 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH), enthält die Komponenten für Waschpuffer und Puffer 2
 - Anti-Digoxigenin-AP, Fab-fragments 150 U, Cat.-No.: 1093274 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH)
 - NBT/BCIP ready-to-use tablets, 20 tablets, Cat.-No.: 1697471 (Roche Diagnostics Mannheim GmbH)

- DIG-markierte Sonden für *stx1* und *stx2* (Herstellung nach Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG 07.18, 7.7.1.1 im Molekularbiologischen Labor des LGL)
- Denaturierungslösung, 1000 ml:
20 g, c = 0,5 mol/l NaOH, ca. 12 % Cl-aktiv, Best.-Nr. 055,
Biesterfeld Chemie distribution GmbH u. Co. KG, Germany)
87,66 g, c = 1,5 mol/l Natriumchlorid, BDH AnalAR[®] Prod. 102415,
1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
1000 ml Aqua dest.
- 0,2 % Triton X100/ 0,5 NaOH, 1000 ml:
2 ml Triton X-100
20 g, c = 0,5 mol/l NaOH ca. 12 % Cl-aktiv, Best.-Nr. 055,
Biesterfeld Chemie distribution GmbH u. Co. KG, Germany)
1000 ml Aqua dest.
- Neutralisationslösung (pH = 7,5), 1000 ml:
121,1 g, c = 1,0 mol/l TRIS, 100 × Concentrate: 0.2 µm filtered, T-9285, 100 ml (SIGMA[®]-ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany)
87,66 g, c = 1,5 mol/l Natriumchlorid, BDH AnalAR[®] Prod. 102415,
58,44 g/mol, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
1000 ml Aqua dest.
- Äquilibrierungslösung (pH = 7,0), 20 × SSC, 1000 ml:
175 g, c = 3 mol/l Natriumchlorid, BDH AnalAR[®] Prod. 102415,
58,44 g/mol, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
88 g, c = 0,3 mol/l TRIS, 100 × Concentrate: 0.2 µm filtered, T-9285, 100ml (SIGMA[®]-ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany)
1000 ml Aqua dest.
Zur Herstellung der jeweiligen Gebrauchslösungen wird diese Stammlösung entsprechend verdünnt.
- Waschlösung 1 (2 × SSC, 1 % SDS), 1000 ml
100 ml, ρ = 1 g/l SDS, 10 % Solution: 0.2 µm filtered, L-4522,
100 ml (SIGMA[®]-ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany)
100 ml 20 × SSC-Lösung
800 ml Aqua dest.

- Waschlösung 2 (2 × SSC, 0,1 % SDS), 1000 ml:
10 ml, $\rho = 1$ g/l SDS, 10 % Solution: 0.2 μm filtered, L-4522,
100 ml (SIGMA[®]-ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany)
100 ml 20 × SSC-Lösung
890 ml Aqua dest.
- Waschlösung 3 (0,5 × SSC, 0,1 % SDS), 1000 ml:
10 ml, $\rho = 1$ g/l SDS, 10 % Solution: 0.2 μm filtered, L-4522,
100 ml (SIGMA[®]-ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany)
25 ml 20 × SSC-Lösung
965 ml Aqua dest.
- Puffer 1 (Maleinsäurepuffer, pH = 7,5), 1000 ml:
11,6 g Maleinsäure
8,76 g Natriumchlorid, BDH AnalaR[®], 58.44 g/mol, Prod.
102415K, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
900 ml Aqua dest.
pH-Wert mit 2N NaOH einstellen und danach auf 1000 ml auffüllen
- Puffer 3 (Detektionspuffer, pH = 9,5), 1000 ml:
15,76 g TRIS, TRIZMA[®] Base, T-8524, 1kg (SIGMA[®]-ALDRICH
CHEMIE GmbH, Germany)
5,85 g Natriumchlorid, BDH AnalaR[®], 58.44 g/mol, Prod.
102415K, 1 kg (VWR International Ltd., Great Britain)
900 ml Aqua dest.
pH-Wert mit 2N NaOH einstellen und danach auf 1000 ml auffüllen
- TE-Puffer (pH = 8,0), 1000 ml
10 ml TRIS-EDTA-Puffer, c = 1,0 mol/l TRIS, 100 × Concentrate:
0.2 μm filtered, T-9285, 100ml (SIGMA[®]-ALDRICH CHEMIE
GmbH, Germany)
990ml Aqua dest.

- *Bestätigungsreaktionen:*

- api 20 E REF 20 100/20 160 (bioMérieux sa, France)
- Sorbitol-MacConkey-Agar, Art. Nr. 1.09207.0500, 500 g (Merck KGaA, Germany), Herstellung durch die Nährbodenküche im LGL

- Enterohämolyisin-Agar mit Blut, Fertignährboden Art. Nr. PB5105A (Oxoid, Great Britain)

8.1.5 PCR und Real-Time-PCR für Shiga Toxin-bildende *E. coli*

8.1.5.1 PCR

- Primer für die PCR:

Die Primer für den Nachweis des *stx1*, KS7 und KS8, und des *stx2*, LP 43 und LP44, weisen folgende Sequenzen auf (Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG 07.18, 7.7.1.1) :

KS 7: 5`-ccc gga tcc atg aaa aaa aca tta tta ata gc- 3`

KS 8: 5` -ccc gaa ttc agc tat tct gag tca acg- 3`

LP 43: 5` -atc cta ttc ccg gga gtt tac g- 3`

LP 44: 5` -gcg tca tcg tat aca cag gag c- 3`

- Programm des Thermocyclers:

Für den Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600) wurde standardmäßig folgendes Temperatur-Zeit-Profil programmiert:

- | | | |
|---|-------|----------|
| - initiale Denaturierung: | 94° C | 5 min. |
| - Zyklusphase: 30-maliges Durchlaufen des folgenden Zyklus (Denaturierung, Anlagerung, Synthese): | | |
| Denaturierung: | 94° C | 1,0 min. |
| Anlagerung: | 44° C | 1,0 min. |
| Synthese: | 72° C | 1,5 min. |
| - Abschließender Syntheseschritt: | 72° C | 5,0 min. |
| - Abkühlung auf: | 4° C | |

8.1.5.2 Real-Time-PCR

- Primer und Sonden für *stx1* und *stx2* (Reischl et al., 2002):

Primer:

STEC-1: gA(Ag)C(Ag)A AAT AAT TTA TAT gTg

STEC-2: TgA TgA Tg(Ag) CAA TTC AgT AT

Sonden:

STEC-I HP-1: TTT Acg TTT TCg gCA AAT ACA gAg ggg AT-[FL]

STEC-I HP-2: [Red 640]-TCg TAC AAC ACT ggA TgA TCT Cag Tgg g-Ph

STEC-II HP-1: TCA ggC ACT gTC TgA AAC TgC TCC TgT gTA-[FL]

STEC-II HP-2: [Red 705]-ACC ATg ACg CCg ggA gAC gTg gAC CT-[Ph]

[FL]: Fluorescein

[Red 640]: LC Red 640-N-hydroxy-succinimide-ester

[Red 705]: LC Red 705-phosphoramidite

[Ph]: 3'-phosphate

g: guanosine

- Primer und Sonden für *eae* und *E-hly* (Reischl et al., 2002):

Primer:

*eae*AF gAC CCg gCA CAA gCA TAA gC

*eae*AR CCA CCT gCA gCA ACA AgA gg

*hly*AF gCA TCA TCA AgC gTA CgT TCC

*hly*AR AAT gAg CCA AgC Tgg TTA AgC

Sonden:

eae-HP-1 ACA gTT CTg AAA gCg AAA TgA TgA Agg C-[FL]

eae-HP-2 [Red 640]-CCT ggT CAg CAg ATC ATT TTg CCA CT-Ph

hlyA HP-1 gCA Tgg CTC TTg ATg AAT TgC TgA gA-[FL]

hlyA HP-2 [Red 705]-CAA Cgg gAA ggA gAg gAT ATA AgT CAg-Ph

FL]: Fluorescein

[Red 640]: LC Red 640-N-hydroxy-succinimide-ester

[Red 705]: LC Red 705-phosphoramidite

[Ph]: 3'-phosphate

g: guanosine

- Programm des LightCyclers®:

- Initialer Denaturierungsschritt: 95° C für 10 Minuten
- 50 Zyklen mit je:
 - Denaturierung: 95° C für 10 Sekunden
 - Anlagerung: 50° C für 20 Sekunden
 - Synthese: 72° C für 30 Sekunden

8.2 Anhang zu „Ergebnisse“

8.2.1 Ergebnisse der Status-quo-Untersuchung im Stall

8.2.1.1 Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu

Tabelle 59: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-------------------------------------|---------|
| 1/1 | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,3 %) | Jungkuh |
| 2/5 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 3/2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 4/8 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 5/1 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 6/2 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 7/7 | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (83,7 %) | Jungkuh |
| 8/8 | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,5 %) | Jungkuh |
| 9/0 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 10/5 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 11/7 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 12/8 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 13/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 14/4 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 15/5 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Jungkuh |
| 16/2 | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,4 %) | Kuh |
| 17/5 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 18/9 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 19/6 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 20/3 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 21/3 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 22/4 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 23/5 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 24/6 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 25/4 | positiv | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 26/0 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 27/M | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Ziege |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 60: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|--------|
| 5/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 16/2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 17/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 18/9 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 19/6 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 20/3 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 21/3 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 22/3 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 23/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |
| 24/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

- Wasserproben (thermophile *Campylobacter* spp.):

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | API-Campy |
|------------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Stall | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Milchkamm. | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Melkstand | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

Milchkamm.: Milchkammer

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 61: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*):

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status des Tieres |
|------|--------------------|--------------------|----------|-------------------|
| 1/1 | -/- | +/+ | positiv | Jungkuh |
| 2/5 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 3/2 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 4/8 | +/+ | +/+ | positiv | Jungkuh |
| 5/1 | -/- | -/- | negativ | Kuh |
| 6/2 | -/- | +/+ | positiv | Jungkuh |
| 7/7 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 8/8 | -/+ | -/- | positiv | Jungkuh |
| 9/0 | -/+ | -/+ | positiv | Jungkuh |
| 10/5 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 11/7 | -/- | +/+ | positiv | Jungkuh |
| 12/8 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 13/0 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 14/4 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 15/5 | -/- | -/- | negativ | Jungkuh |
| 16/2 | -/- | -/- | negativ | Kuh |
| 17/5 | -/- | -/- | negativ | Kuh |
| 18/9 | -/- | -/- | negativ | Kuh |
| 19/6 | +/+ | -/- | positiv | Kuh |
| 20/3 | +/+ | +/+ | positiv | Kuh |
| 21/3 | -/- | -/- | negativ | Kuh |
| 22/4 | +/+ | -/- | positiv | Kuh |
| 23/5 | +/+ | +/+ | positiv | Kuh |
| 24/6 | -/- | -/- | negativ | Kuh |
| 25/4 | +/+ | +/+ | positiv | Kuh |
| 26/0 | -/- | -/- | negativ | Kuh |
| 27/M | -/- | +/- | negativ | Ziege |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Tabelle 62: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api 20E | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 1/1 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 4/8 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | negativ | positiv |
| 6/2 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 8/8 | positiv | +/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | negativ | positiv |
| 9/0 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | negativ | positiv |
| 11/7 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | positiv |
| 19/6 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | positiv |
| 20/3 | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | negativ |
| 22/4 | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | negativ |
| 23/5 | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | negativ |
| 25/4 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | positiv | positiv |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: Bunte Reihe zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte: Test der Sorbitfermentationsfähigkeit

Enterohämolysinpl.: Enterohämolysinplatte zur Feststellung der Hämolysefähigkeit

n. u. : nicht untersucht

-: negativ

+: positiv

Tabelle 63: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status des Tieres |
|------|-----------|---------|----------|-------------------|
| 5/1 | ++ | negativ | negativ | Kuh |
| 16/2 | + | negativ | negativ | Kuh |
| 17/5 | negativ | n. u. | n. u. | Kuh |
| 18/9 | ++ | negativ | negativ | Kuh |
| 19/6 | 4 K | negativ | negativ | Kuh |
| 20/3 | + | negativ | negativ | Kuh |
| 21/3 | 5 K | negativ | negativ | Kuh |
| 22/4 | +++ | negativ | negativ | Kuh |
| 23/5 | 4 K | negativ | negativ | Kuh |
| 24/4 | + | negativ | negativ | Kuh |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

Tabelle 64: Wasserproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | Lactose-TCC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|-------------|------------------|---------|----------|
| Milchkammer | 1 K | negativ | negativ |
| Kuhstall | +++ | negativ | negativ |
| Melkkammer | + | negativ | negativ |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+ : bis zu 10 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

Tabelle 65: humane Stuhlproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Person | ENDO-Agar | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis |
|--------|-----------|--------------------|--------------------|----------|
| A | +++ | -/- | -/- | negativ |
| S | ++ | -/- | -/- | negativ |
| X | +++ | -/- | -/- | negativ |
| T | ++ | -/- | -/- | negativ |
| M | ++ | -/- | -/- | negativ |
| F | +++ | -/- | -/- | negativ |
| K | +++ | -/- | -/- | negativ |

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

8.2.1.2 Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu

Tabelle 66: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-------------------------------------|------------|
| 1/I | positiv | negativ | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | positiv | negativ | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (72,7 %) | Kuh, lakt. |
| 3/G | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,4 %) | Kuh, lakt. |
| 4/I | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (95 %) | Kuh, lakt. |
| 5/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (95 %) | Kuh, tr. |
| 6/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,4 %) | Kuh, lakt. |
| 7/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/F | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,5 %) | Kuh, lakt. |
| 9/I | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/F | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,0 %) | Kuh, lakt. |
| 13/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni doylei</i> (98,7 %) | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung: Tabelle 66: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-------------------------------------|------------|
| 14/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/F | positiv | negativ | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 19/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, tr. |
| 20/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (98,6 %) | Kuh, lakt. |
| 21/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,0 %) | Kuh, lakt. |
| 22/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, tr. |
| 23/S | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,0 %) | Kuh, lakt. |
| 24/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, tr.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 67: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 1/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 21/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung: Tabelle 67: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 23/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 24/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

- Tabelle 68: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|--------------|
| 1/I | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 2/S | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 3/G | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/I | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, trocken |
| 6/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/F | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 9/I | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/C | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/Z | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 12/F | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/Z | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 16/F | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 17/I | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 18/C | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 19/G | -/- | -/- | negativ | Kuh, trocken |
| 20/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/Z | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 22/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, trocken |
| 23/S | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 24/L | -/+ | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh laktierend

Kuh, trocken: Kuh trockenstehend

Tabelle 69: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 1/I | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99.5 %) | negativ | positiv |
| 2/S | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99.5 %) | negativ | positiv |
| 8/F | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99.5 %) | negativ | positiv |
| 11/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 15/Z | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99.5 %) | negativ | positiv |
| 17/I | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99.5 %) | negativ | positiv |
| 21/Z | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99.5 %) | positiv | positiv |
| 23/S | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99.5 %) | negativ | positiv |
| 24/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: Bunte Reihe zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte: Test der Sorbitfermentationsfähigkeit

Enterohämolysinpl.: Enterohämolysinplatte zur Feststellung der Hämolysefähigkeit

+: positiv

-: negativ

n.u.: nicht untersucht

Tabelle 70: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|-----------|---------|----------|------------|
| 1/I | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/S | +(+) | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/G | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/I | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/Z | 3 K | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/Z | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/F | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/I | 4 K | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/C | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/Z | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/Z | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/Z | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/Z | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/F | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/C | 4 K | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 20/Z | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung: Tabelle 70: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|-----------|---------|----------|------------|
| 21/Z | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 23/S | 5 K | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| | ++ | negativ | negativ | Tankmilch |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

8.2.1.3 Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu

- Tabelle 71: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-------------------------------------|------------|
| 1/1 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/5 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/2 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/E | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/E | positiv | negativ | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/R | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,3 %) | Kuh, lakt. |
| 15/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunossay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

- Tabelle 72: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|------------|
| 1/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Tankmilch |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

- Tabelle 73: Wasserproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|----------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Quelle 1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 3 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 74: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 1/1 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/5 | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 3/2 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/E | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/E | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 6/G | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 7/H | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 8/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/L | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/R | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 13/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 75: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api 20E | Sorbitplatte | Enterohämolyseinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|---------------------|
| 2/5 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 5/E | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | negativ | positiv |
| 6/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 7/H | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | negativ | positiv |
| 12/R | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte: Test der Sorbitfermentationsfähigkeit

Enterohämolyseinpl.: Enterohämolyseinplatte zur Feststellung der Hämolysefähigkeit

+: positiv

-: negativ

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 76: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*):

| Kühe | ENDO-Agar | PCR | Ergebnis | Anmerkung |
|------|-----------|---------|----------|------------|
| 1/1 | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/5 | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/2 | 4 K | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/E | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/E | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/G | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/H | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/H | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/H | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/L | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/R | 3 K | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/R | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/R | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/R | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/R | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/R | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| | ++ | negativ | negativ | Tankmilch |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 77: Wasserproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis |
|----------|--------------------|--------------------|----------------|
| Quelle 1 | -/- | -/- | negativ |
| Quelle 2 | -/- | -/- | negativ |
| Quelle 3 | -/- | -/- | negativ |
| Quelle 4 | +/+ | +/+ | positiv |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Tabelle 78: Ergebnis der Keimsuche

| | | | | | |
|----------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api 20E | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
| Quelle 4 | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte: Test der Sorbitfermentationsfähigkeit

Enterohämolysinpl.: Enterohämolysinplatte zur Feststellung der Hämolysefähigkeit

-: negativ

8.2.1.4 Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein

Tabelle 79: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|----------------------------------|------------|
| 1/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 2/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 3/O | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 4/A | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 5/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 6/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 7/E | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 8/W | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 9/M | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Campylobacter coli</i> (98 %) | Kuh, lact. |
| 10/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 11/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 12/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Tabelle 80: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 1/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 2/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 3/O | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 4/A | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 5/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 6/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 7/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 8/W | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 9/M | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 10/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 11/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 12/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Tabelle 81: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 1/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 2/S | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 3/O | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 4/A | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 5/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 6/B | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 7/E | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 8/W | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 9/M | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 10/S | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 11/L | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 12/L | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lact. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lact. : Kuh, laktierend

Tabelle 82: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api 20E | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 2/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 3/O | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 4/A | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 6/B | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 8/W | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 9/M | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 10/S | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 11/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 12/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte: Test der Sorbitfermentationsfähigkeit

Enterohämolysinpl.: Enterohämolysinplatte zur Feststellung der Hämolysefähigkeit

-: negativ

+: positiv

n. u.: nicht untersucht

Tabelle 83: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx 2</i> | Ergebnis | Status |
|------|-----------|--------------------|---------------------|----------|------------|
| 1/B | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 2/S | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 3/O | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 4/A | ++ | negativ | negativ | negativ | Kuh, lact. |
| 5/B | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 6/B | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 7/E | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 8/W | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 9/M | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 10/S | negativ | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lact. |
| 11/L | +++ | negativ | negativ | negativ | Kuh, lact. |
| 12/L | ++ | negativ | negativ | negativ | Kuh, lact. |

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

8.2.2 Ergebnisse des ersten Untersuchungsdurchganges auf den Almen

8.2.2.1 Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu

Tabelle 84: Kotproben Alpe 1 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|------------|-----------|-------------------------------------|-----------|
| 1A/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 2A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 3A/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 4A/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 5A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 6A/2 | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99.2 %) | Kuh, lakt |
| 7A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 8A/6 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 9A/8 | negativ | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt |
| 10A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 85: Milchproben Alpe 1 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1A/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 2A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 3A/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 4A/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 5A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 6A/2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 7A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 8A/6 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 9A/8 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 10A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 86: Wasserprobe Alpe 1 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Quelle | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|--------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 87: Kotproben Alpe 1 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|-------|--------------------|--------------------|----------------|-------------------|
| 1A/5 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 2A/4 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 3A/1 | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 4A/5 | (+)/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 5A/0 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 6A/2 | (+)/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 7A/0 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8A/6 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 9A/8 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10A/4 | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 88: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|-------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 3A/1 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 6A/2 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 10A/4 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte: Test der Sorbitfermentationsfähigkeit

Enterohämolysinpl.: Enterohämolysinplatte zur Feststellung der Hämolysefähigkeit

-: negativ

+: positiv

n. u.: nicht untersucht

Tabelle 89: Milchproben Alpe 1 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|-------|-----------|------------|----------|------------|
| 1A/5 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 2A/4 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 3A/1 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 4A/5 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 5A/0 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 6A/2 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 7A/0 | ++ | -/- u. -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8A/6 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 9A/8 | ++ | -/- u. -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10A/4 | ++ | -/- u. -/- | negativ | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

++: 10 – 20 Kolonien

n. u. : nicht untersucht

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 90: Wasserproben Alpe 1 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Quelle | Laktose-TTC -Agar 3 K | PCR/LC -/- u. -/- | Ergebnis negativ |
|--------|--------------------------|----------------------|---------------------|
| | | | |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

n. u. : nicht untersucht

-: negativ

Tabelle 91: Kotproben Alpe 2 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|-----------|----------|-------------------------------------|-----------|
| 11A/K | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,2 %) | Kuh, lakt |
| 12A/2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 13A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 14A/7 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 15A/4 | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,2 %) | Kuh, lakt |
| 16A/1 | positiv | negativ | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,2 %) | Kuh, lakt |
| 17A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 92: Milchproben Alpe 2 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 11A/K | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 12A/2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 13A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 14A/7 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 15A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 16A/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 17A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 93: Lebensmittel und Wasser Alpe 2 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|--------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Butter | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunosay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 94: Kotproben Alpe 2 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|-------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 11A/K | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 12A/2 | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 13A/4 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 14A/7 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 15A/4 | -/+ | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 16A/1 | (+)/+ | (+)/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 17A/0 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 95: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|-------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 11A/K | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 15A/4 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 16A/1 | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte: Test der Sorbitfermentationsfähigkeit

Enterohämolysinpl.: Enterohämolysinplatte zur Feststellung der Hämolysefähigkeit

-: negativ

n. u.: nicht untersucht

Tabelle 96: Milchproben Alpe 2 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|-------|-----------|---------|----------|------------|
| 11A/K | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 12A/2 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 13A/4 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 14A/7 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 15A/4 | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 16A/1 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 17A/0 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |

++: 10 – 20 Kolonien

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 97: Lebensmittel und Wasser Alpe 2 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | ENDO-/Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|--------|------------------------|---------|----------|
| Butter | ++ | negativ | negativ |
| Quelle | 5 K | negativ | negativ |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

-: negativ

8.2.2.2 Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu

Tabelle 98: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-------------------------------------|------------|
| 1/I | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/I | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,0 %) | Kuh, lakt. |
| 5/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/F | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/I | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (95,6 %) | Kuh, lakt. |
| 14/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/F | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/C | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 19/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (95,6 %) | Kuh, lakt. |
| 21/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 22/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 23/S | ----- | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 24/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 25/G | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (98,9 %) | Kuh, lakt. |
| 26/K | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 27/K | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 28/C | positiv | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt. |
| 29/F | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (98,5 %) | Kuh, lakt. |
| 30/M | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 99: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-------------------------------------|------------|
| 1/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/Z | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 19/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20/Z | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 21/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 22/B | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 23/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 24/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 25/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 26/K | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 27/K | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 28/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 29/F | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 30/M | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (72,5 %) | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 100: Lebensmittel- und Wasserprobe (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivnähr. | Nativprä. | Api-Campy |
|----------|---------|---------|---------------|-----------|-----------|
| Bergkäse | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Bergbach | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 101: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 1/I | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/S | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/G | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 4/I | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/F | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/I | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/C | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 11/Z | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 12/F | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/Z | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 14/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/F | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 17/I | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 18/C | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 19/G | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 20/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 22/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 23/S | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 24/L | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 25/G | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 26/K | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 27/K | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 28/C | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung Tabelle 101: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*):

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 29/F | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 30/M | -/- | (+)/+ | positiv | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 102: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolyisinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|---------------------|
| 3/G | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | positiv |
| 10/C | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | positiv |
| 11/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 13/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 17/I | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 28/C | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | negativ | positiv |
| 30/M | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolyisinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

n. u.: nicht untersucht

-: negativ

+: positiv

Tabelle 103: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|---------------|---------|----------|------------|
| 1/I | ++, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/S | +, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/G | +++ , hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/I | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/Z | ++, helln. u. | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/Z | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/F | +, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/I | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung: Tabelle 103: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*):

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|-----------|---------|----------|------------|
| 15/Z | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/F | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 17/I | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 18/C | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 19/G | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 20/Z | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 21/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 22/B | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 23/S | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 24/L | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 25/G | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 26/K | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 27/K | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 28/C | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 29/F | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 30/M | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 104: Lebensmittel- und Wasserprobe (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | ENDO-/Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|----------|------------------------|---------|----------|
| Alpkäse | ++ | negativ | negativ |
| Bergbach | ++ | negativ | negativ |

++: 10 – 20 Kolonien

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

8.2.2.3 Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Landkreis Oberallgäu

Tabelle 105: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kuh | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-------------------------------------|------------|
| 1/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 2/D | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 3/L | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 4/E | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 5/E | positiv | negativ | negativ | n. u. | n. u. | laktierend |
| 6/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 7/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 8/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 9/H | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99,3 %) | laktierend |
| 10/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 11/R | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 12/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 13/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 14/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 15/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 16/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 17/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 18/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 19/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 20/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 21/R | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 22/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immuno-assay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 106: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kuh | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|------------|
| 1/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 2/D | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 3/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 4/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 5/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 6/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 7/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 8/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 9/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 10/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 11/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 12/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 13/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 14/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 15/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 16/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 17/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 18/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 19/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 20/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 21/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |
| 22/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | laktierend |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 107: Lebensmittel (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|-----------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Alpkäse 1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Alpkäse 2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 108: Wasserprobe (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|------------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Wasserv. 1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Brunnen 1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Brunnen 2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 3 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Wasserv. 2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

Wasserv.: Wasserversorgung

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 109: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|--------------|
| 1/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/D | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/L | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |
| 4/E | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 5/E | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/G | +/+ | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 7/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/L | -/- | +/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/R | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 17/B | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 18/G | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 19/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 20/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/R | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 22/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler („Goldstandard“, fett) gesetzt

+: positiv; -: negativ

n. u.: nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 110: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 4/E | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 6/G | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | positiv | positiv |
| 17/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 18/G | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | positiv | positiv |

LC *eae/hly*:LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E:

„Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolysinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

n. u.: nicht untersucht

+: positiv

-: negativ

Tabelle 111: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|-----------|---------|----------|------------|
| 1/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/D | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/L | negativ | n. u. | positiv | Kuh, lakt. |
| 4/E | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/E | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/G | +++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/L | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/R | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/R | +++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/R | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 17/B | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 18/G | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 19/H | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 20/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/R | +++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 22/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 112: Lebensmittel (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|-----------|-----------|---------|----------|
| Alpkäse 1 | ++ | negativ | negativ |
| Alpkäse 2 | + | negativ | negativ |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

Tabelle 113: Wasserproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|------------|------------------|---------|----------|
| Wasserv. 1 | 2 K | negativ | negativ |
| Brunnen 1 | 4 K | negativ | negativ |
| Brunnen 2 | 4 K | negativ | negativ |
| Quelle 1 | ++ | negativ | negativ |
| Quelle 2 | +++ | negativ | negativ |
| Quelle 3 | + | negativ | negativ |
| Quelle 4 | ++ | negativ | negativ |
| Wasserv. 2 | 5 K | negativ | negativ |

Wasserv.: Wasserversorgung

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

8.2.2.4 Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein

Tabelle 114: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| 1/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/O | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/A | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 6/B | positiv | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/E | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/W | positiv | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/M | positiv | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/S | positiv | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung: Tabelle 114: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|-------|------------|-----------|-----------|------------|
| 11/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh trockenstehend

Tabelle 115: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 1/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/O | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/A | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/B | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 6/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/W | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/M | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 116: Lebensmittel- und Wasserproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|-----------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Weichkäse | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Almkäse | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Brunnen | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 117: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------------|-------------------|
| 1/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 2/S | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 3/O | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 4/A | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 5/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, trocken |
| 6/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 7/E | -/+ | -/- | positiv | Kuh, lact. |
| 8/W | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 9/M | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 10/S | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 11/L | -/+ | -/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 12/L | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lact. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Kuh, trocken: Kuh, trockenstehend

Tabelle 118: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 7/E | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 8/W | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | positiv | positiv |
| 11/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 12/L | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,3 %) | positiv | positiv |

LC *eae/hly*:

LightCycler-Untersuchung auf das *eae*- und das *hly*-Gen

Api 20E:

„Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolysinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

n. u.: nicht untersucht

+: positiv, -: negativ

Tabelle 119: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | Anzucht | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx 2</i> | Ergebnis | Status |
|------|---------|--------------------|---------------------|----------|--------------|
| 1/B | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/S | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/O | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/A | ++ | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/B | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |
| 6/B | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/E | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/W | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/M | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/S | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/L | +++ | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/L | ++ | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trocken: Kuh, trockenstehend

Tabelle 120: Lebensmittel- und Wasserproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | ENDO-/Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|-----------|------------------------|---------|----------|
| Weichkäse | +++ | negativ | negativ |
| Almkäse | +++ | negativ | negativ |
| Brunnen | 5 K | negativ | negativ |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+++ : Rasenwachstum

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

8.2.3 Ergebnisse des zweiten Untersuchungsdurchganges im Sommer

8.2.3.1 Landwirtschaftlicher Betrieb 1, Landkreis Ostallgäu

Tabelle 121: Kotproben Alpe 1 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 1A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 2A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 3A/1 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 5A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 6A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 7A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8A/6 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9A/8 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18A/7 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend; Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 122: Milchproben Alpe 1 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 1A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 2A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 3A/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 4A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 5A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 6A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 7A/0 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8A/6 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9A/8 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18A/7 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend; Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 123: Wasserprobe Alpe 1 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|--------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Quelle | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativpräp.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 124: Kotproben Alpe 1 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|-------|--------------------|--------------------|----------|-------------|
| 1A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 2A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 3A/1 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 4A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 5A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 6A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 7A/0 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8A/6 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 9A/8 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10A/4 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 18A/7 | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 125: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolyisinpl. |
|-------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|---------------------|
| 18A/7 | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99, 3%) | positiv | positiv |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolyisinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

+: positiv

-: negativ

Tabelle 126: Milchproben Alpe 1 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|-------|-----------|---------|----------|-------------|
| 1A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 2A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 3A/1 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 4A/5 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 5A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 6A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 7A/0 | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 8A/6 | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 9A/8 | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10A/4 | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 18A/7 | negativ | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 127: Wasserproben Alpe 1 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Quelle | Laktose-TTC -Agar 4 K | PCR/LC negativ | Ergebnis negativ |
|--------|--------------------------|-------------------|---------------------|
| | | | |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

Tabelle 128: Kotproben Alpe 2 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 11A/K | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 12A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 13A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 14A/7 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 15A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 16A/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt |
| 17A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 19A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20A/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 129: Milchproben Alpe 2 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|-------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 11A/K | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 13A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 14A/7 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16A/1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 19A/4 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20A/5 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend; Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 130: Wasserprobe Alpe 2 (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Quelle | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|--------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 131: Kotproben Alpe 2 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|-------|--------------------|--------------------|----------|-------------|
| 11A/K | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 12A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 13A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 14A/7 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 15A/4 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 16A/1 | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 17A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 19A/4 | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 20A/5 | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lact. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

n. u.: nicht untersucht

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 132: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolyisinpl. |
|-------|-------------|-------------------|---------|--------------|---------------------|
| 16A/1 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 20A/5 | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolyisinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

n. u.: nicht untersucht

Tabelle 133: Milchproben Alpe 2 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|-------|-----------|---------|----------|-------------|
| 11A/K | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 12A/2 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 13A/4 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 14A/7 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 15A/4 | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 16A/1 | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 17A/0 | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 19A/4 | ++ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 20A/5 | + | negativ | negativ | Kuh, lakt. |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 134: Wasserprobe Alpe 2 (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|--------|------------------|---------|----------|
| Quelle | 5 K | negativ | negativ |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

8.2.3.2 Landwirtschaftlicher Betrieb 2, Landkreis Oberallgäu

Tabelle 135: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|------------------------------------|-------------|
| 1/I | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (98.5%) | Kuh, lakt. |
| 6/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/Z | positiv | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/I | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/Z | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (98.7%) | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/Z | positiv | negativ | negativ | negativ | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/C | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 19/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 21/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 22/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 23/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 24/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 25/G | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 26/K | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 27/K | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (99.5%) | Kuh, lakt. |
| 28/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 29/F | positiv | positiv | positiv | typisch | <i>Camp. jejuni jejuni</i> (98.5%) | Kuh, lakt. |
| 30/M | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 136: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 1/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 19/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 21/Z | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 22/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 23/S | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 24/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 25/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 26/K | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 27/K | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 28/C | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 29/F | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 30/M | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 137: Lebensmittel (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|----------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Alpkäse | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Bergbach | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 138: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|-------------|
| 1/I | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/S | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/G | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/I | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 5/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/Z | (+)/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/F | -/- | (+)/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 9/I | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/C | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 11/Z | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 12/F | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 13/Z | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 14/Z | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 15/Z | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 16/F | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 17/I | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 18/C | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 19/G | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 20/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/Z | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 22/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 23/S | -/- | +/+ | positiv | Kuh, trock. |
| 24/L | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 25/G | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 26/K | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung: Tabelle 139: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 27/K | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 28/C | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 29/F | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 30/M | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

- Tabelle 140: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
| 4/I | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 8/F | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 10/C | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 11/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 12/F | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 13/Z | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 14/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 15/Z | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 16/F | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 17/I | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 18/C | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 19/G | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |
| 23/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 28/C | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | negativ |

LC *eae/hly*:

LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E:

„Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolysinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

n. u. : nicht untersucht

-: negativ

Tabelle 141: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-AGAR | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|-----------|---------|----------|--------------|
| 1/I | ++, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/S | +, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/G | +++, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/I | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/Z | ++, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/F | +, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/I | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/C | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/F | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/Z | +++, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/F | +, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 17/I | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 18/C | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 19/G | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 20/Z | ++, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/Z | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 22/B | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 23/S | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |
| 24/L | ++, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 25/G | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 26/K | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 27/K | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 28/C | ++, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 29/F | +++, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 30/M | ++, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft.

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 142: Lebensmittel (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | ENDO-/Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|----------|------------------------|------------|----------|
| Alpkäse | ++, rot | -/- u. -/- | negativ |
| Bergbach | + | -/- u. -/- | negativ |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

-: negativ

8.2.3.3 Landwirtschaftlicher Betrieb 3, Oberallgäu

Tabelle 143: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|------------|
| 1/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/D | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/E | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/G | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 19/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 21/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 22/H | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 144: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|------------|
| 1/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 2/D | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 3/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 4/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 5/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 6/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 7/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 8/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 9/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 10/L | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 11/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 12/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 13/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 14/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 15/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 16/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 17/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 18/G | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 19/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 20/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 21/R | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |
| 22/H | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lakt. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 145: Lebensmittel- und Wasserproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|-----------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Alpkäse 1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Alpkäse 2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Wasserv.1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Wasserv.2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 1 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Quelle 2 | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativpräp.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 146: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 1/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/D | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/L | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/E | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/E | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/G | +/+ | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 7/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/H | -/+ | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 9/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/L | -/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 11/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/R | -/- | -/+ | positiv | Kuh, lakt. |
| 14/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/R | -/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 16/R | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 17/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 18/G | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 19/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |

- Fortsetzung: Tabelle 146: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------|------------|
| 20/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/R | -/+ | -/- | positiv | Kuh, lakt. |
| 22/H | -/- | -/- | negativ | Kuh, lakt. |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 147: Ergebnisse der Keimsuche

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolyisinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|---------------------|
| 6/G | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 8/H | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 10/L | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 13/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 15/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 21/R | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolyisinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

Tabelle 148: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|------------|---------|----------|------------|
| 1/H | ++, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/D | +, rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/L | +++ , hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/E | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/E | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 6/G | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/H | +, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/H | +++ , rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/L | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 12/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 13/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 14/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 15/R | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 16/R | ++, hell | negativ | negativ | Kuh, lakt |

- Fortsetzung: Tabelle 148: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | ENDO-Agar | PCR/LC | Ergebnis | Status |
|------|-----------|---------|----------|------------|
| 17/B | +++ , rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 18/G | ++ , rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 19/H | + , hell | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 20/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 21/R | +++ , rot | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 22/H | negativ | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Tabelle 149: Lebensmittel- und Wasserproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | ENDO-/Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|------------|------------------------|------------|----------|
| Alpkäse 1 | +++ , rot | -/- u. -/- | negativ |
| Alpkäse 2 | ++ , rot | -/- u. -/- | negativ |
| Wasserv. 1 | + | -/- u. -/- | negativ |
| Wasserv. 2 | 5K | -/- u. -/- | negativ |
| Quelle 1 | 3K | -/- u. -/- | negativ |
| Quelle 2 | + | -/- u. -/- | negativ |

Wasserv.: Wasserversorgung

K: Kolonien (Angaben in Kolonien, wenn weniger als 10 gewachsen sind)

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

+++ : Rasenwachstum

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

-: negativ

8.2.3.4 Landwirtschaftlicher Betrieb 4, Landkreis Traunstein

Tabelle 150: Kotproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 1/B | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 2/S | positiv | negativ | untypisch | negativ | n. u. | Kuh, lact. |
| 3/O | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 4/A | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 5/B | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 6/B | positiv | negativ | untypisch | negativ | n. u. | Kuh, lact. |
| 7/E | positiv | negativ | untypisch | negativ | n. u. | Kuh, lact. |
| 8/W | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 9/M | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 10/S | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 11/L | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 12/L | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung (die Prozentzahl in Klammern gibt die %- Identifizierung an, also die Wahrscheinlichkeit dafür, dass das Ergebnis zutrifft)

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 151: Milchproben (thermophile *Campylobacter* spp.)

| Kühe | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy | Status |
|------|---------|---------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 1/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 2/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 3/O | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 4/A | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 5/B | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock |
| 6/B | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 7/E | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 8/W | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 9/M | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 10/S | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, lact. |
| 11/L | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |
| 12/L | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trock. |

ELFA: enzyme-linked fluorescence immunoassay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Kuh, trock.: Kuh, trockenstehend

Tabelle 152: Lebensmittel (thermophile *Campylobacter* spp.)

| | ELFA | PCR | Selektivn. | Nativprä. | Api-Campy |
|---------|---------|---------|------------|-----------|-----------|
| Almkäse | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |
| Brunnen | negativ | negativ | n. u. | n. u. | n. u. |

ELFA: enzyme linked fluorescence immunossay

PCR: selektiv für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Selektivn.: Selektivnährboden nach Skirrow

Nativprä.: Nativpräparat im Phasenkontrastmikroskop

Api-Campy: biochemische Differenzierung

n. u. : nicht untersucht

- Tabelle 153: Kotproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx2</i> | Ergebnis | Status |
|------|--------------------|--------------------|----------------|-------------------|
| 1/B | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 2/S | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 3/O | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 4/A | -/- | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 5/B | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |
| 6/B | +/+ | +/+ | positiv | Kuh, lact. |
| 7/E | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 8/W | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 9/M | -/- | -/- | negativ | Kuh, lact. |
| 10/S | +/+ | -/- | positiv | Kuh, lact. |
| 11/L | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |
| 12/L | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft. Bei diskrepanten Ergebnissen wurde das Ergebnis des LC als „Goldstandard“ (fett) gesetzt

+: positiv

-: negativ

Kuh, lact.: Kuh, laktierend

Kuh, trocken: Kuh, trockenstehend

Tabelle 154: Ergebnisse der Keimsuche:

| Kühe | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolyisinpl. |
|------|-------------|-------------------|-------------------------|--------------|---------------------|
| 2/S | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 4/A | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. |
| 6/B | positiv | -/+ | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |
| 10/S | positiv | -/- | <i>E. coli</i> (99,5 %) | positiv | positiv |

LC *eae/hly*:

LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E:

„Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolyisinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

+: positiv

-: negativ

n. u. : nicht untersucht

Tabelle 155: Milchproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| Kühe | Anzucht | PCR/LC <i>stx1</i> | PCR/LC <i>stx 2</i> | Ergebnis | Status |
|------|----------|--------------------|---------------------|----------|--------------|
| 1/B | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 2/S | ++, hell | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 3/O | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 4/A | ++, rot | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 5/B | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |
| 6/B | ++, hell | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 7/E | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 8/W | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 9/M | neg. | n. u. | n. u. | negativ | Kuh, lakt. |
| 10/S | +, rot | negativ | negativ | negativ | Kuh, lakt. |
| 11/L | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |
| 12/L | n. u. | n. u. | n. u. | n. u. | Kuh, trocken |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

n. u. : nicht untersucht

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

Kuh, lakt.: Kuh, laktierend

Kuh, trocken: Kuh, trockenstehend

Tabelle 156: Lebensmittel - und Wasserproben (Shiga Toxin-bildende *E. coli*)

| | ENDO-/Laktose-TTC-Agar | PCR/LC | Ergebnis |
|---------|------------------------|------------|----------|
| Almkäse | ++, rot | -/- u. -/+ | positiv |
| Brunnen | + | -/- u. -/- | negativ |

+ : bis zu 10 Kolonien

++: 10 – 20 Kolonien

PCR/LC (LightCycler): Proben wurden sowohl PCR wie auch LightCycler überprüft

-: negativ

+: positiv

Tabelle 157: Ergebnis der Keimsuche

| | Kolonieblot | LC <i>eae/hly</i> | Api E20 | Sorbitplatte | Enterohämolysinpl. |
|---------|-------------|-------------------|---------|--------------|--------------------|
| Almkäse | negativ | n. u. | n. u. | n. u. | n.u. |

LC *eae/hly*: LightCycler-Untersuchung auf *daseae*- und das *hly*-Gen

Api 20E: „Bunte Reihe“ zur Speziesidentifizierung

Sorbitplatte und Enterohämolysinpl.: Tests der Sorbitfermentationsfähigkeit und der Hämolysefähigkeit

9 LITERATURVERZEICHNIS

ALLMANN, M.; HOFELEIN, C.; KOPPEL, E.; LUTHY, J.; MEYER, R.;
NIEDERHAUSER, M.; WEGMUELLER, B.; CANDRIAN, U. (1995):
Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in
bacteriological monitoring of dairy products
Res. Microbiol. **146** (1), 85 - 97

ALLERBERGER, F.; SOLDER, B.; CAPRIOLO, A.; KARCH, H. (1997):
Enterohämorrhagische *Escherichia coli* und hämolytisch-urämisches Syndrom
Wien. Klin. Wochenschr. **109** (17), 669 - 677

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M.; SCHWEIGER, P.; RAMMER, H-P.; RESCH,
A.; DIERICH, M.P.; FRIEDRICH, A.W.; KARCH, H. (2001):
Escherichia coli O157 infections and unpasteurised milk
Euro surveillance (EUROPEAN COMMUNICABLE DISEASE BULLETIN) **6** (10),
147 - 150

AMMON, A.; SCHMIDT, K.; BRÄUNIG, J. (2000):
Lebensmittelinfektionen in Deutschland
Bundesgesundheitsbl. **43**, 751 - 757

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 35
LMBG (Mai 2002):
Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis, Isolierung und Charakterisierung
Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und
DNA-Hybridisierungstechnik 07.18
www.methodensammlung-lmbg.de, Beuth Verlag GmbH

APPEL VON, G.; EWALD, C.; HEER, A.; MICKWITZ VON, G.; RÜSSMANN, H.;
MEYER, T.; KARCH, H. (1989):
Vorkommen und Bedeutung von Verotoxin-(shiga-like-toxin)produzierenden
Escherichia coli Stämmen beim Schwein
Tierärztl. Umschau **44**, 410 - 420

BAILY, G. D.; VANSELOW, B. A.; HORNITZKY, M. A.; HURN, S.; EAMENS, G.; GILL, P.; WALKER, K.; CRONIN, J. (2003):

A study of foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria* and *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia

CDI **27** (2), 249 - 257

BALJER, G.; WIELER, L. H.; BAUERFEIND, R.; LUDWIG, S.-B.; MAYR, A. (1990):

Nachweis von Vero- (Shiga-like-) toxinbildenden *E. coli*-Keimen (VTEC) mittels Zellkulturtest und DNA-Hybridisierung bei durchfallkranken Kälbern

Tieraerztl. Umsch. **2**, 71 - 78.

BALJER, G.; WIELER, L. H. (1999):

Tiere als Infektionsquelle für den Menschen – durch EHEC hervorgerufene Erkrankungen

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **106** (8), 339 – 343

BARTELT, E. (2004):

Campylobacter/*Arcobacter* - Bedeutung und Nachweis in Lebensmitteln

Tagungsband Symposium Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittelmikrobiologie, Lemgo, 14. Juli - 16. Juli 2004

BARTELT, E.; LUBER, P. (2004):

Antibiotikaresistenz von *Campylobacter*-Isolaten von Schlachttierkörpern und Handelsproben verschiedener Tierarten

Tagungsband 23. Jenaer Symposium *Campylobacter* Infektionen, Jena, 1. und 2. Juli 2004

BAUERNFEIND, R.; BARTH, S.; TSCHOLCHIEW, A.; VALLEJO, G.; WEISS, R. (2004):

Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* bei Zucht- und Mastschweinen in Deutschland

Tagungsband EHEC-Workshop 2004 Wildbad Kreuth, 22. - 24. Juli 2004, S. 39

- BERTIN, Y.; BOUKHORS K.; LIVRELLI, V.; MARTIN, C. (2004):
Localization of the Insertion Site and Pathotype Determination of the Locus of Enterocyte Effacement of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains
Appl. Environ. Microbiol., **70** (1), 61 - 68
- BETTELHEIM, K. A. (1994):
Biochemical characteristics of *E. coli*
In: GYLES, C.L. (Hrsg.):
Escherichia coli in domestic animals and humans
S. 3 - 30, CAB INTERNATIONAL, Wallingford 1994, UK
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. (1993):
Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals
J. Clin. Microbiol. **31** (9), 2483 - 2488
- BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. (1998):
Human Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* other than Serogroup O157 in Germany
Em. Infect. Dis. **4** (4), 635 - 639
- BIELASZEWSKA, M.; HÜLSMANN, M; FELL, M.; GREUNE, L.; PRAGER, R.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, M.A.; KARCH, H. (2004):
The cytolethal distending toxin genes among Shiga toxin-producing non-O157 *Escherichia coli* strains: Distribution, characterization, genomic location, expression and disease association
Tagungsband 1. EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22. -24. Juli 2004, S. 53
- BOCKEMÜHL, J.; KARCH, H.; RÜSSMANN, H.; ALEKSIC, S.; WIß, R.; EMMERICH, P. (1990):
Shiga-like (Verotoxin)-produzierende *Escherichia coli* O22:H8. Übertragung durch unpasteurisierte Milch mit nachfolgender Erkrankung am hämolytisch-urämischem Syndrom
Bundesgesundheitsbl. **33**, 3 – 6

BOCKEMÜHL, J.; KARCH, H.; TSCHÄPE, H. (1998):

Zur Situation der Infektion des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997

Bundesgesundheitsbl. **41**, 2 - 5

BOND, S. (2003):

University of Saskatchewan News – VIDO starts vaccine work to fight threat of *Campylobacter jejuni*

www.usask.ca/events/news/articles/20010503-1.html

BRANDIS, M.; KARCH, H.; ZIMMERHACKL, L. B.; VERWEYEN, H. und GERBER, A. (2002):

Das hämolytisch- urämische Syndrom

Dtsch. Ärztebl. **99** (4), A-196/B-157/C-153

BRÄUNIG, J.; KLEIN, G. (2001):

Lebensmittelrechtliche Beurteilung von verotoxinogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (VTEC/EHEC)

ALTS 54. Arbeitstagung, Berlin, 19.06. – 21.06.2001

BRETT, K. N.; RAMACHANDRAN, V.; HORNITZKY, M. A.; BETTELHEIM, K. A.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. (2003):

stx_{1c} is the most common Shiga Toxin 1 Subtype among Shiga Toxin producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle

J. Clin. Microbiol. **41**(3), 926 - 936

BRIDSON, E. Y. (1995):

The OXOID Manual 7th Edition 1995

Unipath Limited, Hampshire, England

BROCKMANN, S.; OEHME, R.; DREWECK, C. (2000):

Gruppenerkrankung von Gastroenteritis nach Genuss von Rohmilch - *Campylobacter jejuni*-Nachweis bei Erkrankten und bei Kühen

In: LGA BADEN-WÜRTTEMBERG (2000):

Jahresbericht 1999

BÜLTE, M.; MONTENEGRO, M. A.; HELMUTH, R.; TRUMPF, T.; REUTER, G. (1990):

Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei gesunden Rindern und Schweinen mit dem DNS-DNS-Koloniehybridisierungsverfahren

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **103**, 380 - 384

BÜLTE, M. (2004):

Prävalenz von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) bei Haustieren

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **111** (8), 314 - 317

BÜRK, C.; DIETRICH, R.; ACAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M. (2003):

Identification and Characterization of a new variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin

J. Clin. Microbiol. **45** (5), 2106 - 2112

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ
UND VETERINÄRMEDIZIN (2000):

Empfehlungen zum Nachweis und zur Bewertung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin,
Berlin

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ
UND VETERINÄRMEDIZIN (2001):

Mitteilung der Länder über *Campylobacter*-Nachweise in Deutschland

Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonose-
Infektionen nach der Zoonose-RL (92/117/EWG) für das Jahr 2000, 65 - 71

BUSCH, U. (2002/2004), persönliche Mitteilung:

Diagnostik von EHEC-Infektionen

Vortrag, Bay. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL),
Dienststelle Oberschleißheim

CALDERWOOD, S. B.; ACHESON, D. W. K.; KEUSCH, G. T.; BARRETT, T. J.; GRIFFIN, P. M.; STROCKBINE, N. A.; SWAMINATHAN, B.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; KAPLAN, B. S.; KARCH, H.; O'BRIEN, A. D.; OBRIG, T. G.; TAKEDA, Y.; TARR, P. I.; WACHSMUTH, I. K. (1996):

Proposed new nomenclature for SLT (VT) family

ASM News **62**; 118 - 119

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1983):

International notes outbreak of hemorrhagic colitis - Ottawa, Canada

CDC MMWR Weekly **32** (10); 133 - 134

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1997):

Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and Cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider – Connecticut and New York, October 1996

CDC MMWR Weekly **46** (01); 4 - 8

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2003):

Frequently asked questions about *Escherichia coli* O157:H7

www.cdc.gov

DAVIDSON, R. J.; SPRUNG, D. W.; PARK, C. E.; RAYMOND, M. K. (1989):

Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* in Manitoba raw milk

Can. Inst. Food Sci. Technol. J. **22**, 70 - 74

DEAN-NYSTROM, E. A.; BOSWORTH, B. T.; MOON, W. H.; O'BRIEN, A. D. (1998):

Escherichia coli O157:H7 requires Intimin for enteropathogenicity in calves

Infect Immun. **66** (9); p. 4560 - 4563

DE SILVA, D.; REISER, A.; HERRMANN, M.; TABITI, K.; WITTEWER, C. (1998):

Rapid genotyping and Quantification on LightCycler® with hybridization probes

Biochemica **2**, 12 - 15

DONNISON, A. (2003):

Isolation of thermotolerant *Campylobacter* – Review and Methods for New Zealand Laboratories - Client Report prepared for the Ministry of Health,

May 2003

www.moh.govt.nz

ELMER-ENGLHARD, D.; KNOLL-SAUER, M.; BECK, H. (1998):

Untersuchung von Geflügelfleisch auf thermophile *Campylobacter* - Verbesserte Nachweisverfahren durch eine modifizierte Preston-Anreicherung in Kombination mit Membranfiltration; Erfahrungen mit dem VIDAS-System als Screening-Methode

39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG vom 22. - 25.09.1998 in Garmisch-Patenkirchen

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2000):

Campylobacteriosis

In: Europäische Kommission (Hrsg.):

Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2000 – Summary

S. 9-10, www.europa.eu.int

EUROPÄISCHE KOMMISSION (2000):

Verocytotoxic *E. coli* infections and HUS

In: Europäische Kommission (Hrsg.):

Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2000 – Summary

S. 13, www.europa.eu.int

EUROPÄISCHES PARLAMENT UND EUROPÄISCHER RAT (2003):

Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates

Amtsblatt der Europäischen Union, L325/31-L325/40, 12.12.2003

FINCH, M. J.; BLAKE, P. A. (1985):

Foodborne outbreaks of campylobacteriosis: the United State experience, 1980 -1982

Am. J. Epidemiol. **122** (2), 262 - 268

FRANK, C.; ALPERS, K. (2003):

Infektionen mit EHEC beim Menschen

In: Hartung, M. (Hrsg.):

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland 2002

– Übersicht über die Meldungen der Bundesländer, zusammengestellt vom Nationalen Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen

S. 161 -164, BfR Pressestelle, 14195 Berlin, Germany

FRANK, C.; ALPERS, K.; STARK, K.; AMMON, A. (2004):

Gastroenteritis durch EHEC in Deutschland - Surveillancedaten 2001 - 2003

Tagungsband EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22. - 24. Juli 2004, S. 24

FRIEDRICH, A. W. (2002):

Variabilität der Shiga Toxine in *Escherichia coli*

Hyg. Mikrobiol. **6**, 99 - 104

GALLIEN, P.; KLIE, H.; LEHMANN, S.; PROTZ, D.; HELMUTH, R.; SCHAFER, R.; EHRLER, M. (1994):

Nachweis verotoxinbildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen Nutztieren in Sachsen-Anhalt

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **107** (10), 331 - 334

GALLIEN, P.; TIMM, M.; LEHMANN, S.; STEINRÜCK, H. (2003):

Escherichia coli (STEC/VTEC/EHEC) in 2002

In: Hartung, M. (Hrsg.):

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland 2002

– Übersicht über die Meldungen der Bundesländer, zusammengestellt vom Nationalen Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen

S.177 - 180, BfR Pressestelle, 14195 Berlin, Germany

GARCIA, M. M.; LIOR, H.; STEWART, R. B.; RUCKERBAUER, G. M.; TRUDEL, J. R. R.; SKLJAREVSKI A. (1985):

Isolation, characterization, and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle

Appl. Environ. Microbiol. **49** (3), 667 – 672

GEUE, L.; SEGURA-ALVAREZ, M.; CONRATHS, F. J.; KUCZIUS, T.; BOCKEMÜHL, J.; KARCH, H.; GALLIEN, P. (2002):

A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four German cattle farms

Epidemiol. Infect., **129** (1), 173 - 185

GEUE, L.; SELHORST, T.; SCHNICK, C.; MINTEL, B.; CONRATHS, F. (2004):

Untersuchung zum humanen Gefährdungspotential von potentiellen enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) isoliert in deutschen Rinderbeständen

Tagungsband EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22. -24. Juli 2004, S. 35

GLÜNDER, G.; WEBER, R. M.; AUERBACH, M. I. (2004):

Campylobacter beim Geflügel - eine Übersicht über Verbreitung, Bedeutung und Bekämpfungsmöglichkeiten

Tagungsband 23. Jenaer Symposium Campylobacter Infektionen, Jena, 1. und 2. Juli 2004

GOLL, M.; BÜLTE, M. (2004):

Vorkommen und Charakterisierung von *Escherichia coli* O157-Stämmen beim Pferd

Tagungsband EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22. - 24. Juli 2004, S. 40

HARTUNG, M. (2003):

Mitteilungen der Länder über *Campylobacter*-Nachweise in Deutschland

In: Hartung, M. (Hrsg.):

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland 2002 – Übersicht über die Meldungen der Bundesländer, zusammengestellt vom Nationalen Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen

S.143 - 156, BfR Pressestelle, 14195 Berlin, Germany

HARTUNG, M. (2003):

Mitteilungen der Länder über VTEC/STEC-Nachweise in Deutschland

In: Hartung, M. (Hrsg.):

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland 2002 -
Übersicht über die Meldungen der Bundesländer, zusammengestellt vom
Nationalen Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen
S.165 - 176, BfR Pressestelle, 14195 Berlin, Germany

HEIR, E.; LINDSTEDT, B.-A.; VARDUND, T.; WASTESON, Y.; KAPPERUD, G.
(2001):

Genomic fingerprinting of shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains:
comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and fluorescent
amplified-fragment-length polymorphism (FAFLP)

Epidemiol. Infect. **125**, 537 – 548

HERYFORD, A. G.; SEYS, S. A. (2003):

Cattle and *Campylobacter* - risk factors in rural environments

Northwest Public Health Spring/Summer 2003, 10 - 11

HOVDE, C. J.; AUSTIN, P. R.; CLOUD, K. A.; WILLIAMS, C. J.; HUNT, C. W.
(1999):

Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance

Appl. Environ. Microbiol. **65** (7), 3233 - 3235

HUSU, J. R. (1990):

Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the
faeces of dairy cattle

Zentralblatt Veterinärmedizin **37**, 276 - 282

HUYSMANN, M. B.; TURNIDGE J. D.; WILLIAMS J. H. (1995):

Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods of
identification of thermophilic *Campylobacters*

J. Clin. Microbiol. **33** (12), 3345 - 3346

INGLIS, G. D.; KALISCHUK, L. D. (2003):

Use of PCR of direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces
Appl. Environ. Microbiol. **69** (6), 3435 - 3447

JANKA, A.; BIELASZEWSKA, M.; DOBRINDT, U.; GREUNE, L.; SCHMIDT, M.
A.; KARCH, H. (2003):

Cytolethal distending toxin gene cluster in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
O157:H⁻ and O157:H7 characterization and evolutionary considerations
Infect. Immun. **71** (6), 3634 - 3638

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. (2001):

Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk
J. Dairy Sci. **84**, 2157 - 2162

KADZWALA, R. R.; COLLINS, J. D.; HANNAN, J.; CRINION, R. A.;
O'MAHONY, H. (1990):

Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni*
infection in commercial poultry production
Vet. Record **126**, 305 – 306

KARCH, H.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A. (1996):

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)
Die gelben Hefte **36**; 125 - 135

KARCH, H.; KOHLER, B. (1999):

Neue Erkenntnisse über die Molekularbiologie von Enterohämorrhagischen
Escherichia coli (EHEC) O157
Gesundheitswesen **61** (1), 46 - 51

KARCH, H.; BOCKEMÜHL, J., HUPPERTZ, H.-I. (2000):

Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)
Dtsch. Ärztebl. **97** (3), A-2314/B-2004/C-1862

KARCH, H. (2004):

EHEC in Deutschland - Festvortrag

Tagungsband 1. EHEC-Workshop Wildbad Kreuth 22. - 24. Juli 2004, S. 19

KARMALI, M. A. (1989):

Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*

Clin. Microbiol. Rev. **2** (1), 15 - 38

KARMALI, M. A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P. C.; ARBUS, G. S.; LIOR, H. (1985):

The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*

J. Infect. Dis. **151** (5), 775 - 782

KAYSER, F. H. (1998):

Allgemeine Bakteriologie

In: KAYSER, F. H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R. M.:

Medizinische Mikrobiologie

S. 138 - 220, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

KEAT, A.; ROWE, I. (1991):

Reiter's syndrome and associated arthritis

Rheum. Dis. Clin. North Am. **17** (1), 25 - 42

KEENE, W. E.; SAZIE, E.; KOK, J.; RICE, D. H.; HANDCOCK, D. D.; BALAN, V. K.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. (1997):

An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat

JAMA **227**, 1229 - 1231

KLEIN, G.; WERTH, B-M.; ZIRKELBACH, F.; BARTELT, E. (2004):

Bewertung und Anwendbarkeit von Schnellmethoden zum Nachweis von *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch und -fäzes

Tagungsband Symposium Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittelmikrobiologie, Lemgo, 14. Juli - 16. Juli 2004

KIRSCH, P.; JORES, J.; WIELER, L. W. (2004):

Plastizität bakterieller Genome: Pathogenitätsinseln und der Locus of Enterocyte Effacement (LEE)

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **117**, 116 - 129

KIST, M. (2002):

Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*

Bundesgesundheitsbl. **45**, 497 - 506

KLIE, H.; TIMM, M.; RICHTER, H.; GALLIEN, P.; PERLBERG, K. W.;
STEINRÜCK, H. (1997):

Nachweis und Vorkommen von Verotoxin-bildenden und/oder Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (VTEC und/oder STEC) in Milch

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **110** (9), 337 - 341

KUVDA, I. T.; HUNT, C. W.; WILLIAMS, C. J.; NANCE, U. M.; HOVDE, C. J.
(1997):

Evaluation of dietary influences of *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep

Appl. Environ. Microbiol. **63**, 3878 - 3886

LAIDWELL, T. (2004):

VIDO helps develop vaccine to fight *E. coli* in cattle

In: University of Saskatchewan – On Campus News **11**, (9), 1 - 2

www.usak.ca

LANDER, K. P.; GILL, K. P. W. (1980):

Experimental infection of bovine udder with *Campylobacter coli/jejuni*

J. Hyg. **84**, 421 - 428

LEE, L. H.; BURG III, E.; BAQAR, S.; BOURGEOIS, A. L.; BURR, D. H.;
EWING, C. P.; TRUST, T. J.; GUERRY, P. (1999):

Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*

Infect. Immun. **67** (11), 5799 - 5805

LEHMANN, S.; TIMM, M.; STEINRÜCK, H.; GALLIEN, P. (2003), persönliche Mitteilung:

Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) in Kot von Hochwild und in Wildfleischproben

Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor *E. coli* (NRL-Ec), Dessau

LINE, J. E.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; STERN, N. J.; TOMPKINS, T. (1998):
Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* population in broilers

Poult. Sci. **77**, 405 - 410

LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. (1983):

Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk

Appl. Environ. Microbiol. **46** (2), 459 - 462

MACMANUS, C.; LANIER, J. M. (1987):

Salmonella, *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* in raw milk

J. Food Prot. **50**, 51 - 55

MÄDE, D.; LANGE, D.; KNOBLOCH, H.; FANGHÄHNEL, S.; WORM, R. (2004):
Nachweis des epidemiologischen Zusammenhangs zwischen bovinen und humanen *Campylobacter jejuni* durch IRS-PCR

Tagungsband 23. Jenaer Symposium *Campylobacter*-Infektionen, Jena, 1. und 2. Juli 2004

MAHER, M.; FINNEGAN, C.; COLLINS, E.; WARD, B.; CARROLL, C.; CORMICAN, M. (2003):

Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces

J. Clin. Microbiol. **41**, 2980 - 2986

MEANGER, J. D.; MARSHALL, R. B. (1988):

Seasonal prevalence of thermophilic *Campylobacter* infections in dairy cattle and a study of infection of sheep

New Zealand Vet. J. **37**, 18 - 20

MILLER, JOSEF (2003):

Rede anlässlich des Empfangs bei der Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter am 1. April 2003 in Wildbad Kreuth (Manuskriptfassung)

MINISTERIET FOR FØDERVARER, LANDBRUG OG FISKERI – DANSK ZOONOSECENTER (1999):

Campylobacter jejuni/coli – Poultry, pigs, cattle and sheep

In: Annual Report on Zoonoses in Denmark 1999

www.zoonyt.dzc.dk

MORLOCK, G. (2002), persönliche Mitteilung:

Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Bayern, 01.04.1996 – 31.03.2002, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

NACHAMKIN, I.; ALLOS, B. M. ; HO, T. (1998):

Campylobacter species and Guillain-Barré Syndrome

Clin. Microbiol. Rev. **11**(3), 555 - 567

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A. (1997):

PCR

Spektrum, Akademischer Verlag (3. Auflage), Heidelberg, Berlin, Oxford 1997

N. N. (1996/1997):

Mikrobiologie Handbuch 1996/1997

Merck KGaA, Darmstadt

N. N. (2000):

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz)

www.juris.de

N. N. (2002):

Api-Campy- Handbuch, System zur Identifizierung von *Campylobacter*
bioMérieuxsa® **REF20 800**

N. N. (2002):

VIDAS® *Campylobacter* (CAM)-Handbuch
bioMérieux®sa **30 111**

N. N. (2003):

Almerlebnisweg Ramsau im Berchtesgadner Land - Die Almwirtschaft
www.molkerei-bgl.de

N. N. (2004):

Bioniche *E. coli* O157 vaccine shows further promise
www.bioniche.com

ON, S. L. W. (1996):

Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related
Organisms
Clin. Microbiol. Rev. **9** (3), 405 - 422

ON, S. L. W.; JORDAN, P. J. (2003):

Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter*
jejuni and *Campylobacter coli*
J. Clin. Microbiol. **41**, 330 - 336

ORR, K. E.; LIGHTFOOD, N. F.; SISSON, P. R.; HARKIS, B. A.; TWEDDLE, J.
L.; BOYD, P.; CARROLL, A.; JACKSON, C. J.; WAREING, D. R. A.; FREEMAN,
R. (1995):

Direct milk excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy cow causing cases of
human enteritis
Epidem. Infect **114**, 15 - 24

ORTH, D.; GRIF, K.; DIERICH, M. P.; WÜRZNER, R. (2004):

Erstbeschreibung einer dokumentierten Übertragung eines Sorbitol-fermentierenden Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) O157 durch Tierkontakt in Österreich

Tagungsband EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22. - 24. Juli 2004, S. 34

PARKHILL, J.; WREN, B. W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J. M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R. M.; FELTWELL, T.; HOLROYED, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A.V.; MOULE, S.; PALLAN, M.J.; PENN, C. W.; QUALL, M. A.; RAJANDREAM; M-A.; RUTHERFORD, K. M.; VAN VLIET, A. H. M.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. (2000):

The genome sequence of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences

Nature, **403**, 665 - 668

PERNA, N. T.; PLUNKETT III, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; PÖSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; GALEX, Y.; SCHWARTZ, D. C.; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. (2001):

Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Nature, **409**, 529 - 533

PRÜFER, F. (2004):

Das rekurrende Hämolytisch-Urämische Syndrom im Kindesalter (rechUS)

Tagungsband EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22. -24. Juli 2004, S. 44

RABATSKY-EHR, T.; DINGMAN, D.; MARCUS, R.; HOWARD, R.; KINNEY, A.; MSHAR, P. (2002):

Deer meat as the source for sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut

Em. Infect. Dis. **8** (5), 525 - 527

REISCHL, U.; YOUSSEF, M. T.; KILWINSKI, J.; LEHN, N.; ZHANG, W. L.; KARCH, H.; STROCKBINE, N. A. (2002):

Real-Time Fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*

J. Clin. Microbiol. **40** (7), 2555 - 2565

RICHTER, H.; KLIE, H.; TIMM, M.; GALLIEN, P.; STEINRÜCK, H.; PERLBERG, K. W.; PROTZ, D. (1997):

Verotoxin-produzierende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern in Deutschland

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **110** (4), 121 - 127

RKI (1999):

Ein Ausbruch von *Campylobacter*-Enteritis in Nordrhein-Westfalen

Epidemiol. Bull. **43**, 317 - 320

RKI (2000):

Zwei Gastroenteritis-Ausbrüche durch *Campylobacter jejuni* nach Genuss von Rohmilch

Epidemiol. Bull. **18**, 143 - 145

RKI (2000):

Campylobacter-Enteritis nach Genuß von Rohmilch

Epidemiol. Bull. **26**, 207 - 209

RKI (2000):

Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland - zur Situation im Jahr 1999, Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden) - 2. Folge: Enterohämorrhagische *Escherichia-coli*-Infektionen (EHEC)

Epidemiol. Bull. **34**, 271 - 275

RKI (akt. 2001):

Ratgeber Infektionskrankheiten - 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

Erstveröffentlichung: Epidemiol. Bull. **31/1999**

RKI (2003):

Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten

Ergänzung zum Epidemiologischen Bulletin **50**, 1 - 2

RKI (2004):

Falldefinitionen des Robert-Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern - Ausgabe 2004

www.rki.de

ROBINSON, D. A. (1982):

Campylobacter infection in milking herds

In: NEWELL, D.G. (Hrsg.):

Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry

p. 274, MTP Press Ltd., Lancaster

ROGGENTIN, P.; LEHMACHER A.; BOCKEMÜHL J. (2004):

Unterschiede beim Vergleich der Serogruppen, Altersverteilung und Virulenzfaktoren der EHEC (STEC)-Isolaten von Patienten aus Hamburg und dem übrigen Bundesgebiet

Tagungsband EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22. - 24. Juli 2004, S. 26

ROHRBACH, R. W.; DRAUGHON, F. A.; DAVIDSON, P. M.; OLIVER, S. P. (1992):

Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure

J. Food Prot. **55**, 93 - 97

ROLLE, M.; MAYR, A. (1993):

Allgemeine Infektions- und Seuchenlehre - Unspezifische und antigenspezifische körpereigene Abwehr

In: MAYR, A. (Hrsg.) (1993):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre (6. Auflage)

S. 53 - 83, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1993, Germany

ROTTENGATTER, K. (2003), persönliche Mitteilung:

Molekularbiologischer Nachweis von Pathogenen in Lebensmitteln mit Real-time-PCR

Artus Gesellschaft für molekularbiologische Diagnostik und Entwicklung mbH, Hamburg

SAGNER, G.; GOLDSTEIN, C.; VAN MILTENBURG, R. (1999):

Detection of multiple reporter dyes in real-time, online PCR analysis with the LightCycler® System

Biochemica **2**, 7 – 11

SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L. H.; KARCH, H. (2000):

A new Shiga Toxin 2 variant (*Stx2f*) from *Escherichia coli* isolated from pigeons
Appl. Environ. Microbiol. **66** (3), 1205 – 1208

SCHMIDT-OTT, R.; FELDMAN, S.; BRASS, F.; SCHMIDT, H.; GROSS, U. (2004):

Infektionsserologische Untersuchungen bei Patienten mit Guillain Barré Syndrom in Göttingen

Tagungsband 23. Jenaer Symposium Campylobacter-Infektionen, Jena, 1. und 2. Juli 2004

SCHNEIDER, T. (2004):

Campylobacter - Umsetzung der Zoonoserichtlinie

Tagungsband 23. Jenaer Symposium Campylobacter-Infektionen, Jena, 1. und 2. Juli 2004

SCHWARZELMÜLLER, W. (1993):

Abriss der historischen Entwicklung der Bergland und Almwirtschaft.
Lehrunterlage zur Vorlesung Alpschutz und Alpverbesserung
Eigenverlag des Instituts für Raumplanung und Ländliche Neuordnung,
Universität für Bodenkultur, Wien

SELBITZ, H.-J. (2002):

Bakterielle Krankheiten der Tiere: *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter*
In: ROLLE M., MAYR A. (Hrsg.):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre (7. Auflage)
S. 427 - 432, Enke Verlag, Stuttgart 2002, Germany

SELBITZ, H.-J. (2002):

Bakterielle Krankheiten der Tiere: *Escherichia coli*
In: ROLLE M., MAYR A. (Hrsg.):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre (7. Auflage)
S. 451 - 462, Enke Verlag, Stuttgart 2002, Germany

STANLEY, K. N.; WALLACE, J. S.; CURRIE, J.; DIGGLE, P.; JONES, K. (1998):

The seasonal variation of thermophilic *campylobacters* in cattle
J. Appl. Microbiol. **85**, 472 - 480

STANLEY, K.; JONES, K. (2003):

Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*
J. Appl. Microbiol. **94**, 104S - 113S

STEELE, M. L.; MCNAB, W. B.; POPPE, C.; GRIFFITHS, M. W.; CHEN, S.;
DEGRANDIS, S. A.; FRUHNER, L. C.; LARKIN, C. A.; LYNCH, J. A.;
ODERMERU, J. A. (1997):

Survey of Ontario bulk tank milk for foodborne pathogens
J. Food Prot. **60**, 1341 - 1346

STEIN, MANFRED (2004):

Querschnittsgelähmt durch *Campylobacter jejuni*: das Guillain-Barré-Syndrom
www.das-eule.de

STILLER, C. (1998):

Zum Vorkommen von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Rohmilch von Erzeugerbetrieben in Nordbayern mit Versuchen zur Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* in Milch

Diss. Med. Vet., FU Berlin

STÖCKER, C. F. (2002):

Vorkommen von shigatoxinbildenden *Escherichia coli* (STEC) bei verschiedenen Nutz- und Kleintieren

Diss. Med. Vet., LMU München

STREYER, L. (1996):

Der molekulare Bauplan des Lebens - die Erforschung der Gene

In: STREYER, L. (1999):

Biochemie (1. korrigierter Nachdruck 1999 der 4. Auflage 1996)

S. 123 - 152, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Oxford, Berlin

THURM, V.; STARK, R.; MÄDE, D.; FANGHÄHNEL, S.; BERGER, W.; KNOBLOCH, H.; LANGE, D. (2000):

Rohmilch als Ursache lebensmittelbedingter *Campylobacter*-Infektionen

Bundesgesundheitsbl. **43**, 777 - 780

TIMM, M.; KLIE, H.; RICHTER, H.; GALLIEN, P.; PERLBERG, K.-W.; LEHMANN, S.; PROTZ, D. (1998):

Verfahren zum qualitativen Nachweis von Verotoxin-produzierenden *Escherichia coli* (VTEC) in Lebensmitteln und Fäzes

Bundesgesundheitsbl., **41**, Sonderdruck, 20 – 25

VAN DONKERSGOED, J.; BERG, J.; POTTER, A.; HANCOCK, D.; BESSER, T.; RICE, D.; LEJEUNE, J.; KLASHINSKY, S. (2001):

Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle

Can. Vet. J. **42**, 714 - 720

WASSENAAR, T. (2004):

Sequenzierung des *Campylobacter*-Genoms – Konsequenzen für zukünftige Arbeiten

Tagungsband 23. Jenaer Symposium *Campylobacter* Infektionen, Jena, 1. und 2. Juli 2004

WEBER, A.; BAUER, H.; BAUER-UNKAUF, I.; PUDDICH, U.; SCHREINER, H. (2004):

Vorkommen von *Campylobacter* spp. in Plan- und Beschwerdeproben aus Nordbayern während des Zeitraumes von 2000 bis 2003

Tagungsband 23. Jenaer Symposium *Campylobacter* Infektionen, Jena, 1. und 2. Juli 2004

WEINSTEIN, D. L.; JACKSON, M. P.; SAMUEL, J. E.; HOLMES, R. K.; O'BRIEN, A. D. (1988):

Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin typ II variant from *Escherichia coli* strains responsible for edema disease of swine

J. Bacteriol. **170**, 4223 - 4230

WESLEY, I.V., WELLS, S.J.; HARMON, K.M.; GREEN, A.; SCHROEDER-TUCKER, L.; GLOVES, M., SIDDIQUE, I (2000):

Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle

Appl. Environ. Microbiol. **66** (5), 1994 - 2000

WHO (1999):

New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections – Part I

Weekly Epidemiological Record No.13 1999, **73**, 98 - 101

www.who.int

WHO (1999):

New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections – Part II

Weekly Epidemiological Record No.14 1999, **74**, 105 - 111

www.who.int

WHO (2000):

2000 – *E.coli* O 157 in Canada

www.who.int

YUKI, N.; TAKAHASHI, Y.; TAGAWA, Y.; KASHIWASE, TADOKORO, K.; SAITO, K. (1997):

Association of *Campylobacter jejuni* serotype and antiganglioside antibody in Guillian-Barrè syndrome and Fisher`s syndrome

Ann. Neurol. **42**, 28 - 33

ZHANG, W. L.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. (2002):

Identification, characterization and distribution of a Shiga Toxin 1 gene variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans

J. Clin. Microbiol. **40** (4), 1441 - 1446

ZHANG, W. L.; KÖHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. (2002):

Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains

J. Clin. Microbiol. **40** (12), 4486 - 4492

ZHANG, W. L.; BIELASZEWSKA, M.; FRIEDRICH, A. W.; KUSCIUS, T.; KARCH, H. (2004):

Transkriptionsanalyse von Shiga Toxin 2 Gen-Varianten in *Escherichia coli*-Stämmen

Tagungsband EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22. - 24. Juli 2004, S. 68

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; SHERE, J. A.; GARBER, L. (1995):

Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds

Appl. Environ. Microbiol. **61**, 1290 - 1293

ZIMMERHACKL, L. (2004):

Klinik beim Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS)

Tagungsband EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22. -24. Juli 2004, S. 43

Mein Dank gilt Frau Privatdozentin Dr. habil. Barbara Schalch für die bereitwillige Übernahme der Betreuung bei der Anfertigung sowie die stets gewährte Unterstützung und Aufmunterung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Ulrich Busch und Herrn Dr. Herbert Beck, LGL, Oberschleißheim, denen ich nicht nur die Idee zu dieser Dissertation, sondern auch eine umfassende, engagierte und stets liebenswürdige Betreuung verdanke und des Weiteren bei Frau Thäringen, Frau Zucker, Frau Kocak sowie Frau Dr. Elmer-Englhard für eine freundliche und geduldige Einarbeitung in ein umfangreiches Fachgebiet und die beratende Unterstützung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabors *E. coli* in Dessau unter der Leitung von Dr. habil. Peter Gallien für eine interessante Zusammenarbeit während der Durchführung des Projektes, das auf die Initiative dieser Einrichtung zurückzuführen ist.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Dr. Ludwig und Dr. Götz, Veterinäramt Marktobendorf, Dr. Piendl, Veterinäramt Sonthofen und Dr. Lenze, Veterinäramt Traunstein, die den Kontakt zu den einzelnen Landwirten hergestellt und zum Teil die Probenentnahmen tatkräftig unterstützt haben, sowie bei den Betriebsinhabern der vier beprobten Betriebe und ihren Familien, die durch ihre bereitwillige und stets hilfsbereite Teilnahme das Projekt erst ermöglicht haben.

Für die bereitwillige Übernahme der Serotypisierung einiger STEC-Isolate gilt mein Dank dem RKI, Referenzlabor für Salmonellen und andere Enteritiserreger, Wernigerode, unter der Leitung von Prof. Dr. Tschäpe.

Last but not least ein großes Dankeschön an meine Familie, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht entstanden wäre!

Lebenslauf:

| | |
|------------------------|---|
| Name: | Ute Christine Messelhäuser |
| Geburtsdatum: | 11. November 1978 |
| Geburtsort: | Nürnberg |
| Eltern: | Gerd Messelhäuser Rosemarie Messelhäuser, geb. Mauderer |
| Sept. 1985 – Aug. 1889 | Volksschule Nürnberg |
| Sept. 1889 – Juli 1998 | Willstätter-Gymnasium, Nürnberg |
| Nov. 1998 - März 2002 | Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der LMU, München |
| April 2002 – Aug. 2002 | ERASMUS-Austauschstudentin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität Zürich |
| Okt. 2002 – Dez. 2003 | Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der LMU, München Abschluss: Staatsexamen |
| Jan. 2004 | Approbation als Tierärztin |
| seit Nov. 2004 | wissenschaftliche Angestellte am Bayerischen Landesamt für Gesundheit u. Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim |