

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
Vorstand a. D.: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle
des Veterinärwissenschaftlichen Departments
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Angefertigt am Stadtveterinäramt Karlsruhe,
Abteilung Karlsruher Hygiene Labor
Dr. D. Stegen

**Nachweis von *Escherichia coli* O157 und Shigatoxinen in
Rindfleischproben aus dem Landkreis Karlsruhe und Landkreis Rhein-
Neckar-Kreis unter Einsatz des
Singlepath® *E. coli* O157 und des Duopath® Verotoxins
der Fa. Merck, Darmstadt**

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

von
Nina Anabel Keuerleber
aus Karlsruhe

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Schalch

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Pfister

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern und Großeltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AE-	attaching and effacing-
ALTS	Arbeitskreis lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger
AOAC	Association of Analytical Communities
APEC	Avian pathogenic <i>E. coli</i>
BPF	bundle forming pili
CDC	Center of Disease Control (USA)
CDT	Cytolethal Distending Toxin
CNF	Cytonekrosefaktor
CRGV / CRVG	idiopathic Cutaneous and Renal Glomerular Vasculopathy
DAEC	Diffus-adhärenente <i>E. coli</i> (DAEC)
dest.	destillata
DNA	desoxyribonucleinacid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAggEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EDEC	Edema disease <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIA	Enzymimmunassay
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPEC	Avian pathogenic <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
Fa.	Firma
FIHV	Fleischhygieneverordnung
Gb	Globotriaosylceramid
GLISA	Gold Labelled ImmunoSorbent Assay
HC	Hämorrhagische Colitis
HUS	Hämolytisch Urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMS	Immunomagnetische Separation
k. A.	keine Angabe
LEE-	Locus of Enterocyte Effacement-
LT	hitzelabiles Toxin
MMA-	Mastitis-Metritis-Agalaktie-

n	Anzahl
NSAID	non steroidal anti inflammatory drug
NTEC	Nekrotoxische <i>E. coli</i>
n. u.	nicht untersucht
OMP	outer membrane protein
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction
RKI	Robert Koch Institut
RNA	ribonucleinacid
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SAL	Staatliche Anerkennungsstelle der Lebensmittelüberwachung
sf	Sorbitol fermentierend
spp.	species
ST	hitzestabiles Toxin
STEC	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i>
<i>stx</i>	Shiga Toxin-Gen
syn.	synonym
TK-	Tiefkühl-
TTP	Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura
VO (EG)	Verordnung der Europäischen Gemeinschaft
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxin-bildende <i>E. coli</i>
vWF	von-Willebrandt-Faktor
χ^2	Chi-Quadrat

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR.....	3
2.1	<i>Escherichia (E.) coli</i>	3
2.2	Darmpathogene <i>E. coli</i>	5
2.3	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i> (STEC) / Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC).....	9
2.3.1	Taxonomie	9
2.3.2	Epidemiologie der STEC/EHEC	11
2.3.3	Mikrobiologische Eigenschaften und Pathogenitätsfaktoren von STEC/EHEC	17
2.3.4	Humanmedizinische Bedeutung von EHEC	22
2.3.5	Veterinärmedizinische Bedeutung der STEC	24
2.3.6	Bedeutung der STEC bei Schweinen	25
2.3.7	Maßnahmen im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens	28
2.3.8	Rechtliche Grundlagen.....	30
2.4	Nachweisverfahren für STEC/EHEC	34
2.4.1	Phänotypische Nachweisverfahren	34
2.4.2	Genotypische Nachweisverfahren.....	37
3	MATERIAL UND METHODEN.....	39
3.1	Probenmaterial.....	39
3.2	Beprobte Betriebe	42
3.3	Probenuntersuchung.....	44
3.3.1	Vorbereitung	45
3.3.2	Singlepath® <i>E. coli</i> O157, Fa. MERCK	45
3.3.3	Duopath® Verotoxins, Fa. MERCK	51
4	ERGEBNISSE.....	55
4.1	Auswertung der Ergebnisse	55
4.1.1	Gesamtprobenmenge	55
4.1.2	Proben aus Fleischerfachgeschäften und Supermärkten	61
4.1.3	FrISCHE Proben und tiefgefrorene Proben.....	70
4.1.4	Ergebnisse der Untersuchung mit dem Duopath® Verotoxins.....	80

5	DISKUSSION.....	81
5.1	Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Singlepath® <i>E. coli</i> O157	81
5.2	Ergebnis der Untersuchung mit dem Duopath® Verotoxins	89
5.3	Beurteilung der Eignung des Singlepath® <i>E. coli</i> O157 als Nachweisverfahren in der Lebensmitteldiagnostik.....	90
5.4	Beurteilung der Eignung des Duopath® Verotoxins als Nachweisverfahren in der Lebensmitteldiagnostik.....	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	94
7	SUMMARY.....	95
8	ANHANG.....	96
8.1	Anhang zu Material und Methoden.....	96
8.1.1	Allgemeine Arbeitsmaterialien.....	96
8.1.2	Materialien für die Testdurchführung.....	97
8.2	Anhang zu Ergebnisse	105
8.2.1	Allgemeine Erläuterung zur statistischen Auswertung und Methodik.....	105
8.2.2	Ergebnisse der Untersuchung der Proben aus Metzgereien (n = 79)	106
8.2.3	Ergebnisse der Untersuchung der Proben aus Supermärkten (n = 23)	111
8.2.4	Ringversuch.....	113
9	LITERATURVERZEICHNIS	114

1 EINLEITUNG

Escherichia (E.) coli gehören zur natürlichen Darmflora von Mensch und Tier. Die meisten *E. coli* sind apathogen, einige Stammvarianten können jedoch intestinale und extraintestinale Erkrankungen auslösen.

E.-coli-Stämme des Serotyps O157:H7 gelten als Prototyp der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC), die beim Menschen verschiedene Krankheitsbilder wie die Hämorrhagische Colitis (HC) und das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) hervorrufen können. Die Fähigkeit zur Produktion von Shigatoxinen, Synonym Verotoxinen, gilt als primärer Virulenzfaktor dieser Erregergruppe. Das Shigatoxin-Bildungsvermögen ist jedoch nicht auf diese Serovar beschränkt, sondern konnte mittlerweile bei über 250 verschiedenen *E.-coli*-Serovaren nachgewiesen werden.

Zum Reservoir der Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC, syn. VTEC) zählen insbesondere große und kleine Wiederkäuer. Gelegentlich können STEC auch bei anderen Haus- und Wildtierspezies isoliert werden.

Als Krankheitserreger beim Menschen konnte dieser Erreger erstmals 1982 im Zusammenhang mit zwei Ausbrüchen von hämorrhagischer Colitis in den USA und Kanada nachgewiesen werden. In der Zwischenzeit rangieren die STEC/EHEC in Deutschland gemäß den Daten des Robert-Koch-Instituts unter den „top five“ der bakteriellen Lebensmittelerreger.

Infektionsquellen für den Menschen sind zum Beispiel nicht ausreichend erhitztes Rinderhackfleisch oder rohe oder ungenügend erhitzte Milch. Auch weiß man um die Gefahr der Übertragung durch direkten Tierkontakt.

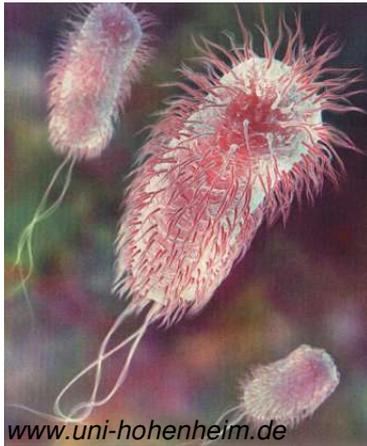
Präventive Maßnahmen wie z. B. Impfungen für den Menschen sind nicht verfügbar und in den nächsten Jahren auch nicht zu erwarten. Besonders wichtig erscheint deshalb eine früh- und rechtzeitige lebensmittelmikrobiologische Diagnostik, die prinzipiell einfach und schnell von jedem Lebensmittel untersuchenden Labor durchgeführt werden kann, um so ein umfassendes Lebensmittelsicherheitsmanagement, das den Anforderungen der heutigen Zeit gerecht wird, zu ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der Prävalenz von *E. coli* O157, sowie von Shigatoxinen in Rindfleischproben kleinständiger Betriebe im Landkreis Karlsruhe und Landkreis Rhein-Neckar-Kreis mit dem Singlepath® *E. coli* O157 und dem Duopath® Verotoxins der Fa. MERCK, Darmstadt. Neben der Nachweisrate wurden auch Praxis- und Routinetauglichkeit dieser Schnelltestsysteme zur primären Detektion auf das Vorliegen einer Probenkontamination mit *E. coli* O157 und Shigatoxinen beurteilt.

2 LITERATUR

2.1 *Escherichia (E.) coli*

Abb. 2.1: *Escherichia coli*



Escherichia (E.) coli sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose, Oxidase-negative, Katalase-positive, stäbchenförmige gerade Bakterien mit einer Breite von ca. 1,1-1,5 μm und einer Länge von ca. 2,0-6,0 μm . Neben peritrich begeißelten Isolatentreten auch unbewegliche in Erscheinung; meist kann außerdem eine Kapselbildung beobachtet werden. Mit einem Wachstumsoptimum von 37 °C sind sie den mesophilen Bakterien zuzuordnen (HOLT et al., 1984, ROLLE et MAYR, 2007). Innerhalb der Gattung *Escherichia* ist nur

diese Spezies von nennenswerter veterinärmedizinischer Bedeutung (ROLLE et MAYR, 2007).

Erstmals beschrieben wurde die Bakterienspezies, die uns heute unter dem Namen *E. coli* bekannt ist, im Jahr 1885 durch den Kinderarzt Dr. Theodor ESCHERICH (1857-1911): er isolierte ein bis dato unbekanntes Bakterium aus dem Stuhl von Säuglingen und bezeichnete es als *Bacterium coli commune*. Im Jahre 1919 wurde dieser Spezies ihm zu Ehren in *Escherichia coli* umbenannt.

Die Neigung der *E. coli* zum horizontalem Genaustausch ist Ursache für die genetische und phänotypische Variabilität und Pathogenität dieser Bakterien (KÖHLER et al., 2001; GYLES, 2007). Die Serotypisierung nach dem modifizierten Kaufmann-Schema ist eine gängige Methode zur Einteilung von *E. coli* und dient z. B. auch der Charakterisierung von STEC (BLANCO et al., 2004, PRAGER et al., 2005). Hiernach werden die Bakterien nach ihren Oberflächen (O)-, Kapsel (K)- und Geißel (H: von Hauch)- Antigenen bezeichnet, wobei die O-Antigene durch den Lipopolysaccharid-Anteil (LPS) der Zellwand bestimmt werden, die H-Antigene durch die Flagellen-Proteine.

E. coli sind wichtiger Bestandteil der physiologischen Flora des hinteren Dünndarms und des Dickdarms des Menschen und verschiedener Vertebraten (ROLLE et MAYR, 2007, GYLES, 2007). In dieser Eubiose macht das Bakterium einen quantitativen Anteil von ca. 1 % der Darmflora aus und wird somit der Begleitflora zugeordnet.

Seine weite Verbreitung in der Umwelt steht in Zusammenhang mit der Ausscheidung über den Kot und seiner hohen Tenazität in feuchtem und halbtrockenem Milieu. Die Besiedlung des Gastrointestinaltraktes des Säuglings bzw. Jungtiers mit *E. coli* beginnt unmittelbar nach der Geburt (NATARO et KAPER, 1998, KAPER et al., 2004). Man unterscheidet die im Darm vorkommenden Stämme in residente, also permanent vorhandene, und transiente, nur vorübergehend den Verdauungskanal besiedelnde Stämme. In ihrer Funktion als Bestandteil der Begleitflora sind sie an Abbauvorgängen und an der Produktion von Vitaminen beteiligt (ROLLE et MAYR, 2007).

Jedoch entwickelten sich einige Stämme dieser Bakterienspezies über den oben erwähnten Genaustausch zu Infektionserregern, die sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin regelmäßig mit septikämisch verlaufenden sowie lokalen intestinalen oder extraintestinalen Infektionen in Zusammenhang gebracht werden (GYLES, 2007).

Im Folgenden eine Zusammenstellung einiger durch *E. coli* ausgelöster Krankheitsbilder der Human- und Veterinärmedizin in Tabelle 2.1 (ROLLE et MAYR, 2007; KAYSER et al., 2001).

Tab.2.1: Zusammenstellung relevanter durch *E. coli* ausgelöster Krankheitsbilder

	Mensch	Tier
Extraintestinal	Urethrozystitis	Colimastitis der Kuh
	Zystopyelitis	MMA-Syndrom der Sauen
	Pyelonephritis	Coligranulomatose des Geflügels
	Septikämien	Wundinfektionen
	Wundinfektionen	Peritonitis
	Appendizitis	Septikämie
	Peritonitis	Pneumonie
	Meningitis	Pyometra
	u. a.	u. a.
Intestinal	Verschiedene Colidiarrhöformen s. auch Kap. 2.2	Verschiedene Colidiarrhöformen s. auch Kap. 2.2

2.2 Darmpathogene *E. coli*

Wie in Kapitel 2.1.2 bereits erwähnt spielen *E. coli* eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese verschiedener intestinaler Infektionen. Dementsprechend finden sie im Infektionsschutzgesetz (IfSG) Berücksichtigung. In § 7, Abs. 1, IfSG werden neben Anderen, „*Escherichia coli*, sonstige darmpathogene Stämme“ in der Liste der meldepflichtigen Nachweise von Krankheitserregern aufgeführt.

Eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der Überwachung und Erforschung dieser Erkrankungen kommt gemäß § 4 IfSG dem Robert-Koch-Institut zu, dass unter anderem gemäß § 4, Abs. 2, Nr. 2a, IfSG auch zur Erstellung von Kriterien für die Übermittlung eines Erkrankungs- oder Todesfalles und eines Nachweises von Krankheitserregern („Falldefinitionen“) verpflichtet ist.

Übermittlungskategorie 14 b der aktuellen Falldefinitionen von 2007 beschreibt die sonstigen darmpathogenen *E. coli* und fasst unter dieser Gruppe die folgenden Krankheitserreger zusammen:

- Enteropathogene *E. coli* (EPEC)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- Enterotoxische *E. coli* (ETEC)
- Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC/EAEC)
- Diffus-adhärenente *E. coli* (DAEC)

Die Einteilung von *E. coli* in diese Pathogruppen erfolgt anhand ihrer Virulenzfaktoren und Pathogenitätsmechanismen, die im Folgenden kurz beschrieben werden:

Charakteristikum der **EPEC** ist die Ausbildung von Attaching-and-effacing-Läsionen am Darmepithel ist. Im Gegensatz zur Gruppe der STEC/EHEC sind die EPEC aber nicht zur Bildung von Shigatoxinen befähigt. Sie gelten als weltweit wichtigste Ursache für Säuglingsdiarrhö (NATARO et KAPER, 1998; KAYSER et al., 2001, JENSEN et al., 2007).

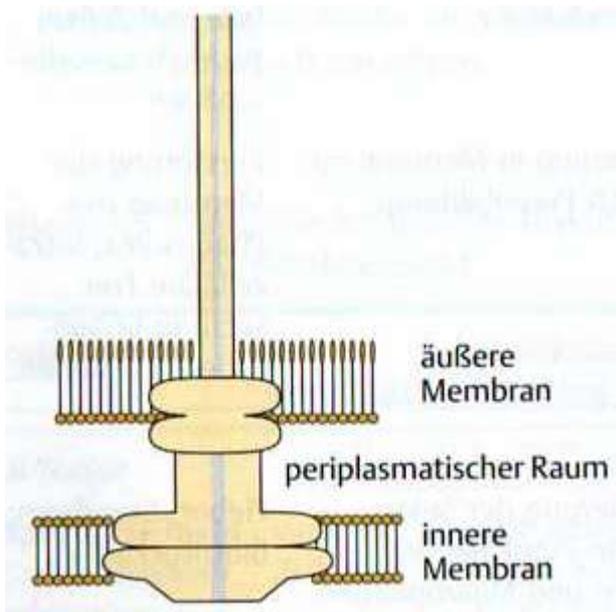
ETEC zeichnen sich durch die Bildung von Enterotoxinen aus, die in zwei Gruppen – hitzelabiles Toxin (LT) und hitzestabiles Toxin (ST) – unterschieden werden, die beide nochmals in die Untergruppen LTI, LTII, STa und STb aufgeteilt werden.

Mitbestimmend für die Pathogenese ist zudem eine fimbrienvermittelte Anheftung an Enterozyten (NATARO et KAPER, 1998; KAPER et al., 2004, ROLLE et MAYR, 2007).

ETEC gelten als Erreger von Diarrhöen bei Neugeborenen und Jungtieren von Rindern, Schweinen und anderen Tierarten. Beim Menschen lösen sie die Reisediarrhöe aus (MERAZ et al., 2008).

Pathogenese und klinisches Bild einer Infektion mit **EIEC** ähneln beim Menschen einer Shigellose, ein Krankheitsbild, das durch die Zerstörung der Dickdarmschleimhaut charakterisiert ist. EIEC weisen Pathomechanismen auf, die den Bakterien der Gattung *Shigella* sehr ähneln. So ist ihre Invasivität ebenfalls auf ein plasmid-kodiertes Typ-III-Sekretionssystem (s. Abb. 2.2) zurückzuführen. Eine Pathogenität für Tiere konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden (THAMM, 2000; ROLLE et MAYR, 2007, PARSOT, 2005).

Abb. 2.2: Nadelkomplex des Typ-III-Sekretionssystems (aus KAYSER et al., 2001)



Bei Kontakt bestimmter gramnegativer Stäbchenbakterien mit eukaryotischen Zielzellen interagiert ein Sensormolekül mit einem Rezeptor der Zielzellen. Diese Interaktion resultiert in einer Öffnung eines Sekretionskanals des Nadelkomplexes (der durch die Zytoplasmamembran und die äußere Membran hindurchreicht) und in der Ausbildung einer Pore in der Membran der Zielzelle. Durch den Kanal und die Pore werden zelltoxische Moleküle transloziert. Diese blockieren z.B. die Fähigkeit zur Phagozytose, hemmen die Produktion von Zytokinen (bei Makrophagen), zerstören das Zytoskelett der Zielzelle oder fördern die Apoptose.

EAggEC verursachen wässrige, gelegentlich auch hämorrhagische Diarrhöe bei Säuglingen und Kleinkindern. Über eine Tierpathogenität ist nichts Sicheres bekannt (KAYSER et al., 2001; ROLLE et MAYR, 2007; DOW et al., 2006).

DAEC konnten aus Durchfallstühlen von Menschen isoliert werden, auch im Zusammenhang mit der Reisediarrhö, jedoch besteht bis heute nur geringe Kenntnis über ihre Tierpathogenität. Ein Vorkommen bei Hunden ist beschrieben (THAMM, 2000).

Die Gruppe wurde aufgrund des Nachweises zweier spezifischer Fimbrien definiert. Ob die *E. coli* dieser Gruppe in der Lage sind Toxine zu bilden, ist nicht bekannt (ROLLE et MAYR, 2007, MERAZ, 2008).

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle noch die Gruppe der geflügelpathogenen Stämme, Avian pathogenic *E. coli* (**APEC**) erwähnt, auch wenn sie nicht primär darmpathogen sind.

Eine bedeutsame Erkrankung ist u. a. die Coliseptikämie, bei der es je nach Serovar zur Besiedlung des Respirationstraktes und anderer innerer Organe kommt und in der Folge beispielsweise zu erhöhter Embryo- und Frühsterblichkeit, Luftsack- und Dottersackentzündungen, Perikarditis, Polyserositis oder Salpingitis. Seltener Erkrankungen ausgelöst durch APEC sind die Coligranulomatose, sowie Septikämien nach Coliinfektionen bei Ziergeflügel (ROLLE et MAYR, 2007).

Ausgenommen aus der oben genannten Übermittlungskategorie sonstiger darmpathogener *E.-coli*-Stämme sind Infektionen mit enterohämorrhagischen *E. coli* (**EHEC**), auch wenn diese natürlich ebenfalls zur Gruppe der intestinalen *E. coli* zählen. Für diese bedeutende Gruppe hat das RKI eine eigene Falldefinition herausgegeben. Eine gesonderte Beschreibung erfolgt in Kapitel 2.3.

Die Falldefinitionen dienen dem Gesundheitsamt als Orientierung dafür, in welchen Fällen Daten an die zuständige Landesbehörde und über diese dann an das RKI weiterzugeben sind. Sie legen nicht die Kriterien für die Übermittlung von Daten an das Gesundheitsamt fest und sollen auf keinen Fall als Empfehlung zum diagnostischen Vorgehen in der Klinik oder im Labor missverstanden werden.

Im Falle der sonstigen darmpathogenen Stämme hat die Meldung in vier Fällen zu erfolgen, nämlich wenn eine klinisch-epidemiologische oder klinisch-labordiagnostisch bestätigte Erkrankung vorliegt oder eine Infektion labordiagnostisch nachgewiesen wurde, jedoch das klinische Bild nicht der akuten *E.-coli*-Enteritis entspricht oder es nicht bekannt ist.

Als labordiagnostischer Nachweis gilt entweder die kulturelle Erregerisolierung aus dem Stuhl in Verbindung mit der Zuordnung des Isolats zu einem der oben aufgeführten *E.-coli*-Pathovaren (direkter Erreger-Nachweis) oder der Nucleinsäure-Nachweis eines Gens für etablierte Virulenzfaktoren (z. B. *eae*) ebenfalls verbunden mit der Zuordnung zu einem *E.-coli*-Pathovar (Virulenzfaktornachweis).

Von einem epidemiologischen Zusammenhang mit einer labordiagnostisch nachgewiesenen Infektion spricht das RKI beim Menschen im Falle einer direkten Übertragung oder dem Kontakt zu einer gemeinsamen Expositionsquelle innerhalb der Inkubationszeit von 9-72 Stunden (RKI, 2007).

2.3 Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) / Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

2.3.1 Taxonomie

Die Produktion von Shigatoxinen gilt als das wichtigste Virulenzmerkmal der STEC/EHEC. Für die Toxinbildung codierende Gene liegen auf temperenten Phagen innerhalb des Bakteriengenoms. Durch Phageninfektion können diese Gensequenzen leicht auf nicht toxinbildende *E. coli* - Stämme übertragen werden (SCOTLAND et al., 1983).

Die Shigatoxine werden wegen ihres zytotoxischen Effekts gegenüber Verozellen (Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze) auch als Verotoxine (VT) bezeichnet. Gelegentlich findet sich auch noch die Bezeichnung Shiga-like-Toxin. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass diese Toxine nicht nur shigellentoxinähnliche Eigenschaften besitzen, sondern in ihrer Aminosäuresequenz weitgehend mit den Shigellentoxinen identisch sind, so dass heute überwiegend die Bezeichnung Shigatoxine (Stx) verwendet wird (KONOWALCHUK et al., 1977; O'BRIAN et al., 1982).

Als Erreger schwerwiegender gastrointestinaler und extraintestinaler Krankheitsbilder wie z. B. der Hämorrhagischen Colitis (HC) oder des Hämolytisch Urämischen Syndroms (HUS) werden in der Humanmedizin alle *E. coli*, die in der Lage sind, diese Erkrankungen auszulösen, als enterohämorrhagische *E. coli*, also EHEC, bezeichnet. Die Beschreibung der klinischen Manifestation erfolgt in Kapitel 2.3.4.

Auch wenn die Shigatoxine die Pathogenitätsfaktoren für die Entstehung der genannten Krankheitsbilder sind, löst nicht jeder STEC obligatorisch HC oder HUS beim Menschen aus. Aufgrund noch ungenügender Kenntnisse über die Pathomechanismen, Mutationsfähigkeit und noch uneindeutiger labordiagnostischer Differenzierung zwischen den einzelnen Erregern, ist momentan jedoch noch jeder STEC als potenzieller EHEC anzusehen. Diese Tatsache führt dazu, dass die Begriffe STEC/VTEC und EHEC synonym verwendet werden.. Einige Autoren legten daher folgendes fest: alle beim Menschen gefundenen Isolate werden als EHEC bezeichnet, alle beim Tier gefundenen Isolate mit den Synonymen STEC oder VTEC (FRANK und ALPERS, 2003, LEHMANN et al., 2003).

Auch die Serotypisierung der STEC/EHEC erfolgt nach der O:K:H-Seroformel und spielt bei der Beurteilung eines STEC/EHEC bezüglich seiner Einstufung als potenziell pathogen eine wichtige Rolle, da der Nachweis eines bestimmten Serovars oder speziellen O-Antigens in vielen Fällen schon einen Hinweis auf die Virulenz des

isolierten Stammes (SELBITZ, 2002) gibt. KARMALI et al. (2003) teilten die verschiedenen Serotypen entsprechend ihrer Pathogenität für den Menschen in fünf Gruppen A bis E ein. Wie aus Tabelle 2.2 hervorgeht, wurde der Serotyp O157 aufgrund seiner hohen Nachweisrate bei Krankheitsausbrüchen und seiner starken Verbindung zur Auslösung von HUS und HC der Gruppe A zugeordnet.

Tab. 2.2: Klassifizierung von STEC entsprechend Ausbruchshäufigkeit und Pathogenität (modifiziert nach GYLES, 2007)

Sero-pathotyp*	Serotyp	Zusammenhang mit einem Ausbruch	Beteiligung an Ausbrüchen	Assoziation mit HUS und HC**
A	O157:H7, O157:NM	hoch	üblich	ja
B	O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM	mäßig	unüblich	ja
C	O5:NM: O91:H21, O104:H21; O113:H21; O121:NM: O165:H25 u. a.	niedrig	selten	ja
D	O7:H4: O69:H11; O103:H25: O113:H4; O117:H7: 119:H25: O132:NM; O146:H21: O171:H2: O172:NM: O174:H8 u. a.	niedrig	selten	nein
E	O6:H34; O8:H19: O39:H49: O46:H38: O76:H7; O84:NM: O88:H25; O98:H25: O113:NM: O136:NM: O143:H31: O156:NM: O163:NM u. a.	kein Zusammenhang	kein Zusammenhang	nein

* nach Vorgaben von KARMALI et al., 2003

** HUS = Hämolytisch Urämisches Syndrom; HC = Hämorrhagische Kolitis

2.3.2 Epidemiologie der STEC/EHEC

Die Entstehung der EHEC scheint erst vor relativ kurzer Zeit stattgefunden zu haben. Der bislang älteste bekannte EHEC-Stamm, der Serotyp O26, stammt aus dem Jahr 1965 (SCOTLAND et al., 1990). Vermutlich wurde das Toxin-codierende Gensegment von *Shigella dysenteriae* Typ 1 auf *E. coli* übertragen. EHEC-Bakterien scheinen demzufolge eine durch horizontalen Gentransfer entstandene, humanpathogene Keimgruppe zu sein.

Mittlerweile zählen die enterohämorrhagischen *E. coli* zur Gruppe der bedeutendsten Erreger bakteriell bedingter Gastroenteritiden, wobei die Begründung hierfür nicht primär in der Häufigkeit des Vorkommens, sondern viel mehr in der Schwere der durch EHEC hervorgerufenen Erkrankungen liegt. Im Gegensatz zu den anderen darmpathogenen *E.-coli*-Pathovaren fallen EHEC-Infektionen nämlich durch extra-intestinale Komplikationen auf, die mit einer nicht unerheblichen Letalität einhergehen (RKI, 2008a).

Enterohämorrhagische *E. coli* wurden erstmals 1982 als für den Mensch pathogen identifiziert, als man Stämme des bis dato unbekanntes *E. coli* O157:H7 als Erreger zweier Ausbrüche von hämorrhagischer Colitis in den USA und kurz darauf in Kanada nachweisen konnte (RILEY et al., 1983, CDC, 1983, KARCH et al., 2000).

Erste Erkrankungen in Deutschland registrierte man 1988 (KARCH et al. 1990). Seit diesem Zeitpunkt werden regelmäßig auf der ganzen Welt Ausbrüche gemeldet, die auf EHEC-Infektionen zurückzuführen sind.

In Deutschland kam es in den letzten Jahren mehrfach zu einem vermehrten Auftreten von HUS-Erkrankungen, sämtlich verursacht durch eine Sorbitol-fermentierende Variante von EHEC O157, ohne dass bislang eine Infektionsursache ermittelt werden konnte. Traditionelle EHEC-Ausbrüche (bei denen nicht überwiegend HUS-Erkrankungen beobachtet wurden) waren nach Datenlage des RKI bis 2008 selten. Die Infektionsquelle konnte nur in wenigen Fällen geklärt werden (RKI, 2008d).

Das Österreichische Referenzzentrum für EHEC berichtet in seinem Jahresbericht 2007, dass die Zahl der humanen EHEC- und STEC- Fälle im Vergleich zum Vorjahr um 60 % gestiegen sei, die Inzidenz für HUS-Fälle lag bei 0,99 per 100.000 Kinder im Alter von 0-14 Jahren. Größere EHEC-Ausbrüche ereigneten sich in Österreich in 2007 nicht, lediglich 3 Familienausbrüche wurden registriert (Österreichische Referenzzentrum für EHEC, 2007).

Tab.2.3: Ausgewählte *E. coli* O157 Ausbrüche im Ausland

Land	Jahr	Vektor	Quelle
USA	1982	„Hamburger“	RILEY et al., 1983
Kanada	1985	Sandwiches, Mensch-zu-Mensch	CARTER et al, 1987
USA/Kanada	1996	unpasteurisierter Apfelsaft	CDC, 1996
GB (Schottland)	1996/1997	Sandwiches	COWDEN et al., 2001
USA/Kanada	1999	Badewasser (See)	BRUCE et al., 2003
USA/Kanada	2000	Milchviehbetrieb/Tierkontakt	CDC, 2001
Kanada	1999	Salami	MCDONALD et al., 2004
Kanada	2002	Salat, Sandwiches	BOLDUC et al., 2004
USA	2006	Fast food	CDC, 2006
USA	2007	Tiefkühl-Pizza („Peperoni“)	CDC, 2007
USA	2008	Hackfleisch	CDC, 2008

Ebenso wie die sonstigen darmpathogenen *E. coli*, fallen auch die EHEC unter die meldepflichtigen Krankheitserreger gemäß § 7, Abs. 1, IfSG und finden dementsprechend Eingang in die Falldefinitionen des RKI. Das klinische Bild einer akuten EHEC-Infektion ist gemäß diesen dann erfüllt, wenn der Patient mindestens an Durchfall, krampfartige Bauchschmerzen oder Erbrechen leidet.

Als positiver labordiagnostischer Befund gilt eine Erregeranzucht und -isolierung in Kombination mit einem Shigatoxin-Nachweis mittels ELISA bzw. Shigatoxin-Gen-Nachweis mit PCR, abhängig von der Qualität der Probe (Stuhl, Mischanreicherungskultur, *E.-coli*-Isolat).

Die Angaben zur epidemiologischen Bestätigung geben die vielfältigen Übertragungsmöglichkeiten wieder. Genannt werden hier Mensch-zu-Mensch-Übertragung, gemeinsame Expositionsquellen wie Badegewässer, Lebensmittel oder Tierkontakt, Baden in kontaminierten Gewässern und Kontakt zu nachgewiesenermaßen infiziertem Tier, dessen Ausscheidungen oder Verzehr seiner Produkte (z. B. Rohmilch). Natürlich bestätigt auch der Verzehr eines Lebensmittel, in dessen Resten STEC nachgewiesen wurden, einen epidemiologischen Zusammenhang. Die Inkubationszeit ist mit 2-10 Tagen beschrieben und muss natürlich bei der Beurteilung eines epidemiologischen Zusammenhangs mitberücksichtigt werden.

Eine Übermittlung der Daten an das RKI erfolgt wie schon bei den sonstigen darmpathogenen *E. coli* in folgenden Fällen:

- bei klinisch-epidemiologischer Bestätigung,
- bei klinisch-labordiagnostischer Bestätigung,
- bei labordiagnostisch nachgewiesener Infektion mit nicht erfülltem klinischem Bild oder
- bei labordiagnostisch nachgewiesener Infektion bei unbekanntem klinischem Bild.

Im Falle einer rein klinisch diagnostizierten Erkrankung ist eine Datenweitergabe nicht notwendig.

In den aktuellen Falldefinitionen, gültig seit dem 1. Januar 2007, ist das enteropathische HUS aus der Übermittlungskategorie der EHEC ausgenommen und wird separat in den Falldefinitionen gelistet, wobei kein Unterschied mehr zwischen inkomplettem und komplettem HUS, sowie thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura gemacht wird. In diesem Kapitel werden alle Fälle mit dem klinischen Bild eines enteropathischen hämolytisch-urämischen Syndroms erfasst, unabhängig von Erreger und dessen Nachweis.

Das klinische Bild eines akuten enteropathischen HUS liegt per definitionem dann vor, wenn mindestens zwei der folgenden drei Kriterien erfüllt sind:

- hämolytische Anämie
- Thrombozytopenie ≤ 150.000 Zellen/mm³
- Nierenfunktionsstörung

Typischerweise geht dem enteropathischen HUS das oben beschriebene klinische Bild eine akuten EHEC-Infektion voraus. Auch können zusätzlich zerebrale Symptome auftreten. Diese Symptome beim Patienten sind jedoch keine Voraussetzung für die Einstufung in diese Übermittlungskategorie.

Die weiteren Angaben zu labordiagnostischer und epidemiologischer Bestätigung decken sich mit denen der EHEC-Falldefinition. Die Übermittlung eines Falles an das RKI richtet sich jedoch nach anderen Kriterien, und zwar ist im Falle eines enteropathischen HUS schon das klinische Bild ohne weiteren Nachweis Indikation für die Weitergabe der Daten, während der alleinige labordiagnostischer Erregernachweis ohne Erkrankung an HUS kein Grund für die Meldung beim RKI als HUS-Fall darstellt.

Gesetzliche Grundlage für die Aufnahme des HUS in die Falldefinitionen liefert § 6 IfSG, nach dem HUS in der Liste der meldepflichtigen Krankheiten aufgeführt ist.

Im Jahr 2007 wurden in Deutschland 839 Durchfall-Erkrankungen durch EHEC, sowie 44 Fälle von enteropathischem HUS ermittelt, welche den Referenzdefinitionen des RKI entsprachen (RKI, 2008b). Um dieses Kriterium zu erfüllen, muss die Erkrankung entweder klinisch-epidemiologisch oder klinisch-labordiagnostisch bestätigt sein. Fälle, in denen das Krankheitsbild untypisch oder nicht bekannt ist werden also nicht berücksichtigt. Wie aus Tabelle 2.4 ersichtlich, liegen diese Zahlen unter den in den Jahren 2005 und 2006 ermittelten (RKI, 2008b; RKI 2006a). Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertation war das Jahr 2008 in den statistischen Tabellen des RKI noch nicht aufgeführt, jedoch decken sich die Zahlen für 2008, die in der Datenbank des RKI (<http://www3.rki.de/SurvStat>) zu finden sind, mit denen von 2007 (s. Tab. 2.4).

Tabelle 2.4: Jahresstatistik meldepflichtiger Krankheiten nach Bundesland, Deutschland, 2006 -2008 (RKI, 2008b)

		Deutschland			
Meldekategorie		2005	2006	2007	2008
EHEC-Erkrankungen	Anzahl	1162	1179	839	839
	<i>außer HUS</i> Inzidenz	1,4	1,4	1	1
HUS, enteropathisch	Anzahl	79	63	44	46
	Inzidenz	< 0,1	0,1	0,1	k. A.

k. A.: keine Angabe

Es zeigte sich eine statistisch signifikante Saisonalität mit gehäuftem Auftreten der Krankheitsbilder im Sommer/Spätsommer (RKI, 2006a; FRANK et WERBER, 2007) und im Herbst (RKI, 2006a).

Die bundesweite EHEC-Inzidenz lag 2007 bei 1,0 Erkrankten pro 100.000 Einwohner, wobei Sachsen (1,6), Bayern, Schleswig-Holstein (je 1,4) und Rheinland-Pfalz (1,3) im Bundesvergleich die Spitzenpositionen einnahmen. In Baden-Württemberg lag die Inzidenz bei 0,8 (RKI, 2008b).

2005 und 2006 lag die bundesweite Inzidenz mit 1,4 EHEC-Erkrankungen pro 100.000 Einwohner höher. Die Verteilung auf die Bundesländer gestaltete sich wie auszugsweise in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tab. 2.5: Die Bundesländer mit der höchsten EHEC-Inzidenzen 2005 bis 2007 (RKI, 2008b; RKI, 2006a)

	EHEC-Inzidenz					
	Baden-Württemberg	Bayern	Brandenburg	Rheinland-Pfalz	Schleswig-Holstein	Sachsen
2005	-	2,1	2,1	1,9	1,9	-
2006	1,3	1,7	1	1,5	2,1	1,9
2007	0,8	1,4	0,7	1,3	1,4	1,6

Ferner besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Rindern und der Erkrankungsinzidenz: laut einer Studie von STARK et al. war die Rinderdichte signifikant positiv mit der STEC-Gesamtinzidenz assoziiert (STARK et al., 2007).

2005, wie auch 2004 betraf fast die Hälfte der übermittelten EHEC-Erkrankungen (46 %) Kinder unter fünf Jahren. Auch bei HUS-Erkrankungen dominierten Kleinkinder: 65 % waren unter fünf Jahren. Mittlere Altersgruppen waren kaum betroffen: nur 3,9 % der Erkrankten waren zwischen 15 und 59 Jahren und 10,3 % über 60 Jahre alt (RKI, 2006a).

Mittlerweile weiß man, dass die Gruppe der EHEC eine große Variabilität aufweist und mehr als 200 Serotypen dieser Gruppe zugeordnet werden können.

In angelsächsischen Ländern, Japan, aber auch Argentinien nimmt STEC O157 bei großen Ausbrüchen die Vorreiter-Stellung ein (BEUTIN et al., 2007).

Etwas anders stellt sich die Verteilung in Deutschland dar. Das RKI gibt hierzu folgende Zahlen an:

Bei 42 % übermittelten EHEC-Fälle wurden Angaben zum Serovar gemacht, davon gehörten 46 % zu den drei häufigsten Gruppen O103 (17 %, erstmals häufiger im Zusammenhang mit EHEC-Infektionen nachgewiesen als O157), O157 (16 %) und O26 (13 %). Ebenfalls oberhalb der 10 Prozentgrenze: O91 (11 %).

Weitere Serotypen, die im Zusammenhang mit EHEC-Infektionen standen, selten auch als Ursache von HUS ermittelt wurden, waren O55, O145, Ont (nicht typisierbar), O128, O R-Form, O111, O146, O23, O6 und andere.

In 82 % der EHEC-assoziierten Fälle von HUS wurde die O-Gruppe eindeutig übermittelt: Bei 74 % wurde O157 nachgewiesen, was die These von der erhöhten Virulenz von O157 gegenüber anderen EHEC Serogruppen stützt. So wurden

O157-Stämme überproportional häufig im Zusammenhang mit HUS-Infektionen nachgewiesen (WERBER et al., 2003, RKI, 2006a, CHART et CHEASTY, 2008, VARELA et al., 2008, ORTH et al., 2009).

Abweichend vom bedeutendsten Serotyp O157:H7 werden vor allem Sorbitol-fermentierende (sf) EHEC O157:H- zunehmend häufig mit HUS-Ausbrüchen assoziiert (KARCH et al., 1993, ALPERS et al., 2007, FRUTH et al., 2007, ROSSER et al., 2008, ORTH et al., 2009).

Der erste bekannte EHEC-Ausbruch 1982 ließ sich auf den Verzehr von ungenügend erhitzten Hamburgern zurückführen.

Des Weiteren gelten die folgenden Übertragungswege als gesichert (RKI, 2001):

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

Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass bei Kleinkindern, der Bevölkerungsschicht mit der höchsten EHEC- und HUS-Inzidenz, Lebensmittel eine untergeordnete Rolle spielen und vielmehr der Kontakt zu Wiederkäuern im Vordergrund steht (RKI, 2006a).

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 et WIELER; 1999, BLANCO et al. 2005). Eine Studie zum Vorkommen von STEC im Kot von Schlachtrindern ergab 1997 eine Nachweisrate von 47,6 % (RICHTER et al., 1997). In der Schweiz wurde im Jahr 2004 eine STEC-Prävalenz in Schafkot von 29,9 % ermittelt (ZWEIFEL et al., 2004), *E. coli* O157 in Rinderkotproben konnte in 1,6 % der untersuchten 2930 Proben detektiert werden (AL-SAIGH et al., 2004).

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

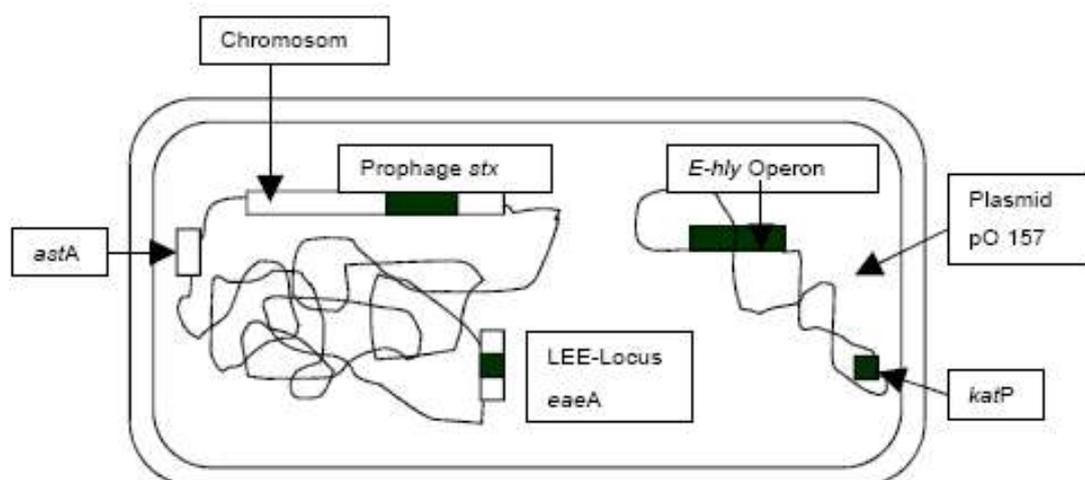
29 - 82 % bei den beprobten Tieren (GEUE et al., 2002); die dort gewonnenen Isolate besaßen alle das genetische Potenzial typischer EHEC-Stämme, so dass ein Gefährdungspotenzial für den Menschen gegeben ist (GEUE et al., 2004).

2.3.3 Mikrobiologische Eigenschaften und Pathogenitätsfaktoren von STEC/EHEC

Im Gegensatz zu anderen *E.-coli*-Bakterien sind die typischen Serotypen O157:H7 nicht befähigt, Sorbitol innerhalb von 24 Stunden zu fermentieren und nicht in der Lage beta-Glucuronidase zu produzieren. Bei Temperaturen oberhalb von 44,5 °C ist das Wachstum dieses Bakteriums stark eingeschränkt (MANAFI, 2000, MANAFI, 2005). Serotyp O157:H7 kann im Gegensatz zu zahlreichen anderen pathogenen Keimen im sauren Milieu überleben (CHEUNG, 2003). So existieren Berichte über Krankheitsausbrüche nach dem Konsum von frisch gepresstem, nicht pasteurisiertem Apfelsaft (RKI, 2003, ALPERS et al., 2004) sowie von Mayonnaise und mayonnaisehaltigen Soßen und Dressings (ERICKSON et al., 1995).

Signifikante Virulenzfaktoren konnten sowohl durch Gewebsuntersuchungen an HUS- und HC-Patienten, als auch durch die Anwendung genetischer Verfahren identifiziert werden.

Abb. 2.3: Virulenzfaktoren von EHEC (MESSELHÄUSSER, 2005):



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

Im Folgenden eine kurze Beschreibung der einzelnen in Abbildung 2.3 gezeigten Virulenzfaktoren, eingeteilt nach ihrer Lokalisierung auf Chromosom oder Plasmid pO157 der EHEC:

2.3.3.1 Chromosomal lokalisierte Virulenzfaktoren

Intimin

Das *eae*-Gen ist Teil des LEE (Locus of Enterocyte Effacement), der wichtigsten und am meisten verbreiteten Pathogenitätsinsel darmpathogener *E. coli*. Das LEE codiert für ein Typ-III-Sekretionssystem, ein Adhäsin (Intimin) und verschiedene über das Typ-III-Sekretionssystem sezernierte Proteine.

Diese Gene sind für die Ausbildung von so genannten attaching and effacing (AE-) Läsionen am Darmepithel verantwortlich (KARCH et KOHLER, 1999, PERNA et al., 2001, KIRSCH et al., 2004, BEUTIN et al., 2004)

Eine Beschreibung und bildliche Darstellung erfolgte bereits im Zusammenhang mit EPEC in Kap. 2.2.7.

Shigatoxine

Namensgebendes Merkmal aller STEC ist die Fähigkeit zur Produktion von Shigatoxinen. Diese werden aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung auf Verozellen (transformierte Affenierene epithelzellen) auch als „Verotoxine“ bezeichnet. Entsprechend ihrer biologischen Aktivität werden Shigatoxine zur Familie der Ribosomen-inaktivierenden Proteine gezählt.

Momentan bekannt sind zwei Shigatoxingruppen von *E. coli*: Shigatoxin 1 (stx1) mit den Subtypen stx1c und 1d (ZHANG et al., 2002, BÜRK et al., 2003, BRETT et al., 2003) und Shigatoxin 2 (stx2) mit den Subtypen stx2c, 2d, 2e und 2f (WEINSTEIN et al., 1988, SCHMIDT et al., 2000). Während das stx1 nahezu identisch mit dem Shigatoxin von *Shigella dysenteriae* ist, zeigt sich bei stx2 zur eine 60 prozentige Aminosäure-Sequenzhomologie zu stx1 (FRIEDRICH, 2002).

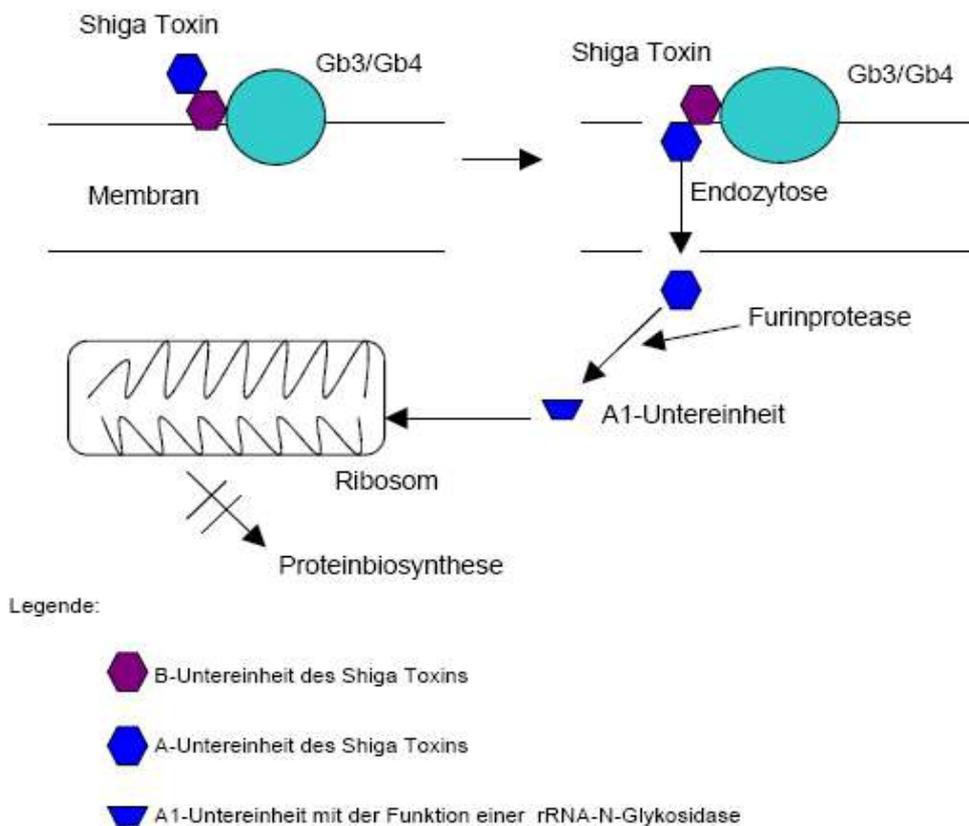
In ihrer Wirkungsweise zählen die Shigatoxine, ähnlich wie die Cholera-toxine, zu den bifunktionellen Holotoxinen oder AB-Toxinen. Sie bestehen aus einer B-Untereinheit zur spezifischen Bindung an die Oberfläche der Zielzelle und einer A-Untereinheit als eigentliche Wirkkomponente (KARMALI, 1998, KAYSER et al., 1997). Die zytotoxische Wirkungsweise begründet sich in der Bindung der B-Untereinheit an bislang zwei bekannte Rezeptoren der Endothelzellen (s. Abb. 2.4): stx1, stx2 und stx2c an

Globotriaosylceramid 3 (Gb3) und stx2e an Globotriaosylceramid 4 (Gb4). Für die übrigen Varianten sind die Rezeptoren noch unbekannt.

Via Rezeptoren erfolgt dann eine Endozytose des Toxins ins Zellinnere, wobei eine membranständige Furinprotease die A-Untereinheit spaltet.

Es entsteht ein aktives A1-Fragment, das in der Lage ist die Proteinsynthese der Zelle zu blockieren. Es hydrolysiert einen spezifischen Adenylrest der ribosomalen RNA, was eine sterische Veränderung des Aktionszentrums der Elongationsfaktoren und die Blockierung der Peptidbiosynthese zur Folge hat (KARMALI, 1998, FRIEDRICH, 2002).

Abb. 2.4: Skizze des Funktionsmechanismus der Shigatoxine (Zytotoxizität) EHEC (aus MESSELHÄUSSER, 2005):



Die Verbreitung der einzelnen STEC variiert gemäß ihrer Toxinbildung. Stx1, stx1c, stx2, stx2c und stx2d finden sich überwiegend in *E. coli* humaner Stuhlproben und Rinderkotproben, während sich stx2e fast ausschließlich bei Schweinen mit Ödemkrankheit findet (WEINSTEIN et al., 1988). Stx2f konnte bis jetzt nur in Taubenisolaten gefunden werden (SCHMIDT et al., 2000, FRIEDRICH, 2002).

Eine Studie des österreichischen Referenzzentrums für EHEC zeigte außerdem, dass weniger die Menge an Shigatoxinen, sondern vielmehr der *stx*-Genotyp und eventuell andere bis jetzt noch unbekannte Faktoren hauptsächlich die Entstehung von HUS festlegen (ORTH et al., 2007). Bei der Untersuchung von 201 STEC-Stämmen konnte gezeigt werden, dass *stx2* und *stx2c* eine hohe Virulenz und Fähigkeit zur HUS-Auslösung haben, hingegen *stx2d*, *stx2e*, *stx1* und *stx1c* mit milden und asymptomatischen Infektionen einher gehen. Eine Quantifizierung der Shigatoxine zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen HUS-assoziierten Stämmen und Stämmen, die mildere Verlaufsformen hervorriefen (ORTH et al., 2007).

In Studien des Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) konnte gezeigt werden, dass *stx1* in humanen Stuhlproben dominierte, gefolgt von *stx2*. Ein gleichzeitiges Vorkommen von *stx1* und *stx2* kam am seltensten vor (MORLOCK, 2002; SCHREIBER, 2008). Erklärt wurde diese Verteilung damit, dass der Großteil der untersuchten Proben von symptomlosen Ausscheidern oder nur leicht erkrankten Personen stammten.

Tab. 2.6: Prozentuale Verteilung von *stx1* und *stx2* in Stuhlproben aus Bayern

Jahr	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1+stx2</i>	Quelle
1996-2002	40%	31%	29%	MORLOCK, 2002
2002-2006	43%	36%	21%	SCHREIBER, 2008

Cytolethal distending toxins (CDTs)

Ebenso wie viele andere Bakterien sind auch *E.-coli*-Stämme in der Lage neben den beschriebenen Shigatoxinen so genannte CDTs zu bilden.

Bis jetzt wurden fünf verschiedene *cdt* Allele in *E.-coli*-Stämmen entdeckt, wobei bei einzelnen Serotypen *cdt* chromosomal-, bei anderen plasmidkodiert ist. Die Pathogenität einzelner non-O157-Stämme könnte auf die CDT-Aktivität zurückzuführen sein (JANKA et al., 2003, BIELASZEWSKA et al., 2004).

2.3.3.2 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren

Hämolysin

Zu den plasmidkodierten Virulenzdeterminanten zählt das *hly*-Gen (*E-hly*), was für ein porenbildendes Zytotoxin, das Hämolysin kodiert (SCHMIDT et al., 1995). *E-hly* dient neben anderen Pathogenitätsfaktoren zur Charakterisierung von EHEC.

Die Hämolsine lagern sich in die Membran der Wirtszelle ein und schaffen so hydrophile Spalten, wodurch die Ionenkonzentration beeinflusst wird. In weiterer Folge werden Entzündungsmediatoren aus Granulozyten und Mastzellen freigesetzt. Dieses porenbildende Zytolysin zeigt auf bluthaltigen Nährmedien einen enterohämolytischen Phänotyp, der kleine trübe Hämolysehöfe um die Bakterienkolonien aufweist. Dieses Hämolysin tritt auch bei allen O157:H7 auf, die von HUS-Patienten isoliert wurden und es wurde entdeckt, dass HUS-Patienten Antikörper gegen dieses Hämolysin besitzen (CHART et CHEASTY, 2008, MANAFI, 2005).

Subtilase

In den vergangenen Jahren ist ein weiteres Zytotoxin, die Subtilase (SubAB), entdeckt worden, dem eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von klinischen Symptomen im Zusammenhang mit einer EHEC-Infektion zukommen könnte. Die Subtilase wurde erstmals bei einem EHEC-Stamm, der für einen HUS-Ausbruch in Australien verantwortlich gemacht wurde, nachgewiesen. Die intraperitoneale Injektion des Zytotoxins löste bei Mäusen schwere Mikroangiopathie und Nekrosen an Gehirn, Leber und Niere aus, was zu der Annahme führte, dass dieses Zytotoxin als Cofaktor zum Shigatoxin eine Schlüsselposition einnimmt (PATON et al., 2004; PATON et PATON, 2005; OSEK 2006; KHAITAN et al., 2007, MORINAGA et al., 2007, SCHREIBER, 2008). In der Tat konnte SubAB gehäuft bei *stx2*-positiven und *eae*-negativen EHEC-Stämmen von Mensch und Rind gefunden werden (OSEK, 2006; KHAITAN et al., 2007). In Untersuchungen von Schreiber konnte Subtilase bei einem *eae*-positiven Stamm und auch im Zusammenhang mit *stx1* nachgewiesen werden (SCHREIBER, 2008).

2.3.4 Humanmedizinische Bedeutung von EHEC

Wie bereits erwähnt, liegt die Bedeutung von EHEC nicht in der Häufigkeit des Vorkommens, sondern vielmehr in der Schwere der durch diesen Erreger ausgelösten Erkrankungen begründet. Das Robert-Koch-Institut (RKI) unterscheidet in seinen aktuellen Falldefinitionen zwischen EHEC-Erkrankung und enteropathischem Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). Die in früheren EHEC-Falldefinitionen enthaltene Differenzierung zwischen inkomplettem und komplettem HUS und thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP) entfällt (s. auch Kap. 2.3.1).

Nach einer Inkubationszeit von ein bis drei (bis acht Tagen) tritt ein meist wässriger Durchfall auf, der bei einem Teil der Patienten in eine blutig-wässrige Colitis übergehen kann. Bauchschmerzen, vor allem im Unterbauch, sind ein häufiges Begleitsymptom; insbesondere bei Kindern werden auch Fieber, Übelkeit und Erbrechen beobachtet. Meist tritt eine wässrige Enteritis auf, in der Altersgruppe unter 14 Jahren in etwa 80 Prozent der klinischen Fälle (HUPPERTZ et al., 1996). Als wichtigste extraintestinale Komplikation kann vor allem bei Kindern im Kindergartenalter (Durchschnittsalter: 2,9 Jahre) (ZIMMERHACKL, 2002), aber auch bei älteren Menschen (GYLES, 2007), ein HUS auftreten. 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, ZIMMERHACKL et al. 2002). Im Gegensatz zu atypischem HUS, dass ohne Diarrhö auftritt (KAVANAGH et al., 2006; AMIRLAK et AMIRLAK, 2006), geht bei typischem HUS primär eine Durchfallphase voraus. (ZIMMERHACKL, 2007). Wenige Tage nach Beginn oder kurz nach Besserung der Durchfälle verschlechtert sich plötzlich der Allgemeinzustand, es kommt zu Erbrechen, Bauchschmerzen, Lethargie, Blässe, Ikterus, Petechien der Haut und schließlich zu akutem Nierenversagen, das in ein bis drei Prozent der Fälle tödlich endet (ZIMMERHACKL, 2004) oder bei Überleben in über zehn Prozent zum terminalen Nierenversagen führt; Notwendigkeit zur Nierentransplantation oder lebenslange Dialysepflicht sind die Folgen. Anstelle des kompletten HUS mit der Trias hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen werden auch inkomplette Verlaufsformen als akutes Nierenversagen mit entweder einer hämolytischen Anämie oder einer Thrombozytopenie beschrieben (AMIRLAK et AMIRLAK, 2006); neben den Nieren, können auch andere Organe wie zentrales Nervensystem, Lunge, Pankreas und Herz betroffen sein (NIETSCH, 2001, GYLES, 2007).

Ebenso ist ein rekurrendes HUS v. a. bei Kleinkindern beschrieben, dessen Pathogenese noch nicht geklärt ist. 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 Angaben von bis zu 15 Jahren (BRANDIS et al., 2002).

Inwieweit Autoantikörper gegen den von-Willebrand-Faktor oder gegen andere Komplementproteine eine Rolle spielen wird diskutiert (ZIMMERHACKL, 2007).

Obwohl EHEC gegen Antibiotika in der Regel gut empfindlich sind, gilt eine antibiotische Therapie wegen der Gefahr der vermehrten Toxinfreisetzung und der damit verbundenen extraintestinalen Komplikationen zumindest während der akuten Krankheitsphase als kontraindiziert (RKI, 2008a). Auch der Einsatz von nichtsteroidalen Antiphlogistika, Motilitätshemmern und Narkotika sollte in der Vor- und Akutphase vermieden werden (ZIMMERHACKL, 2007).

Da eine kausale Therapie von EHEC-Infektionen und vor allem des HUS nicht zur Verfügung steht, sind supportive Maßnahmen zur Abwendung vermeidbarer Komplikationen entscheidend. Hierzu zählen vor allem der Versuch der forcierten Diurese zu Beginn des HUS, die sorgfältige Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz und der rechtzeitige Einsatz der Dialyse. Andere therapeutische Ansätze zielen auf die Unterbindung der Translokation der Shigatoxine aus dem Darm. Ein aus bovinem Kolostrum hergestelltes Präparat mit in vitro potenter Wirkung gegen Shigatoxin und EHEC-Hämolysin (LISSNER et al., 1996), zeigte eine günstige Wirkung in einer randomisierten Doppelblind-Studie mit an EHEC erkrankten Kindern. Verglichen mit Kontrollen fand sich eine Minderung von Stuhlfrequenz und Dauer der Durchfallerkrankung (HUPPERTZ et al., 1999). Ein HUS oder andere Komplikationen wurden bei keinem der behandelten Kinder beobachtet. Damit steht die symptomatische Behandlung mit Ersatz von Flüssigkeit und Elektrolyten im Vordergrund.

Aktuell ist zudem der Einsatz von Anti-Antikörpern Thema der Forschung (CHART et CHEASTY, 2008, MA et al., 2008).

2.3.5 Veterinärmedizinische Bedeutung der STEC

Auf die epidemiologische Bedeutung von Wiederkäuern als Reservoir wurde bereits in Kapitel 2.3.2 eingegangen.

Bei den übrigen Haustieren, sowie bei Wild- und Zootieren spielen STEC als Krankheitserreger eine maximal untergeordnete Rolle.

Jedoch können sie Träger von STEC sein und somit sollten sie als potenzielle Ansteckungsquelle in epidemiologische Überlegungen mit einbezogen werden.

2.3.5.1 Bedeutung der STEC bei Hauswiederkäuern

Man geht davon aus, dass STEC bei erwachsenen Rindern zur normalen Darmflora zählen; Erkrankungsfälle werden bei Kälbern beschrieben (BALJER et al., 1990). Das Erregerspektrum der neonatalen Kälberdiarrhö umfasst vor allem verschiedene ETEC- Stämme (SELBITZ, 2002). Dass aber auch *E. coli* O157:H7 bei Kälbern wässrig-blutige Diarrhö hervorrufen kann, konnten amerikanische Forscher in Infektionsversuchen nachweisen; auch Todesfälle wurden beschrieben (DEAN-NYSTROM et. al., 1998). Neben der neonatalen Kälberdiarrhö 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 euterivirulent zu charakterisieren. Es ist somit nicht auszuschließen, dass bei einem solchen Geschehen auch STEC beteiligt sind, vor allem, da eine Euterinfektion häufig durch Umgebungskeime verursacht werden (SELBITZ, 2002).

Zusammenfassend ist zu sagen dass die ETEC- und STEC-Stämme, die bei Tieren ernst zunehmende Erkrankungen hervorrufen, bei humanen Erkrankungsfällen nicht von Bedeutung sind.

2.3.6 Bedeutung der STEC bei Schweinen

E. coli O157:H7 werden vergleichsweise selten aus Schweinekotproben isoliert. Schweine gelten somit nicht als Reservoir dieses Serovars, sondern eher als zufällige sporadische Ausscheider (JOHNSEN et al., 2001). Mehrfach isolierte man von dieser Tierart aber atypische *E.-coli*-Stämme, denen das Shigatoxinbildungsvermögen fehlte (CHAPMAN et al., 1997, OSEK, 2004).

BAUERFEIND et al. konnten des Weiteren in 225 porcinen *stx2*-positiven Isolaten nur Gene der Toxin-Variante *stx2e* identifizieren. Andere Toxin-Varianten oder das *eae*-Gen waren nicht nachweisbar. 73,3% der Stämme waren den Serogruppen O138, O139 und O141 zuzuordnen (BAUERFEIND et al., 2004).

Bei Ferkeln werden, ähnlich wie bei Kälbern, ETEC-Stämme als Erreger der Coliruhr der Saugferkel und der Colidiarrhö 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 Gefäßläsionen zur Ödembildung, zur Schädigung des Nervengewebes und schließlich zur Enzephalomalazie. Diese *E. coli* werden verschiedentlich auch als Gruppe der „edema disease *E. coli*“ (EDEC) zusammengefasst (WEINSTEIN et al., 1988). Sie zählen allerdings nach heutigen Erkenntnissen nicht zu den Zoonoseerregern (APPEL et al., 1998, BÜLTE et al., 1990, EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2000, SELBITZ, 2002, BAUERFEIND et al., 2004).

2.3.6.1 Bedeutung der STEC bei Pferden

Immer wieder wurden Pferde in Zusammenhang mit humanen EHEC-Erkrankungen gebracht. So wurden bei einem in Bayern auftretenden HUS-Fall Minipferde als wahrscheinliche Infektionsquelle ermittelt, mit denen ein Kleinkind regelmäßig Kontakt hatte. Die von den Tieren gewonnenen Isolate von *E. coli* O157:H- wiesen in wesentlichen Merkmalen eine Übereinstimmung mit dem bei dem Patienten isolierten Stamm auf (RKI, 1999).

Auch aus Großbritannien liegen mehrere derartige Berichte vor (TREVINA et al., 1996, CHALMERS et al., 1997, WILLSHAW et al., 2003).

Die STEC-Prävalenz bei Pferden scheint aber trotz allem vergleichsweise niedrig zu sein, so dass sie nicht als Reservoir, sondern wie die Schweine eher als zufällige

sporadische Ausscheider angesehen werden sollten (SANDER, 2002). Spezifisch stellen sie auch kein Reservoir für Shigatoxin-bildende *E. coli* O157:H7/H- dar (GOLL, 2005).

STEC-ausscheidende Tiere sind meist symptomlos. Für eine Beteiligung am Krankheitsgeschehen des Menschen liegen keine eindeutigen Belege vor (GOLL, 2005).

2.3.6.2 Bedeutung der STEC bei Kleinen Haustieren

Bei Hunden und Katzen sind STEC regelmäßig nachweisbar, *E. coli* O157-Stämme in den vorliegenden Studien jedoch nie. Beide Spezies müssen auch als mögliche Vektoren in Betracht gezogen werden. So konnte das Landratsamt Landshut in Zusammenarbeit mit dem LGL eine EHEC-Infektion bei einem Kleinkind auf den Kontakt mit einer im Haushalt lebenden Katze zurückführen (SCHRANNER et al., 2007).

Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von *eae*- und *stx1*-positiven *E.-coli*-Isolaten an der Pathogenese akuter und chronischer Diarrhö-Erkrankungen bei Hunden liegen vor (SANCAK et al., 2004). Ein möglicher Zusammenhang wurde auch bei der „idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds“ (CRGV oder CRVG) gesehen. Diese Erkrankung, erstmals Mitte der 80er Jahre in Alabama aufgetreten (CARPENTER et al., 1988) und aufgrund der Hautläsionen von Hundebesitzern und -trainern als „Alabama rot“ bezeichnet, weist klinische und pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit dem HUS des Menschen auf (HERTZKE et al., 1995, FENWICK et CONWAN, 1998). Offenbar bestand ein Zusammenhang zwischen der Verfütterung von nicht durcherhitztem Rinderhackfleisch und dem Auftreten von CRVG. Teilweise konnten STEC-Stämme aus CRVG-erkrankten Greyhounds isoliert werden, ein eindeutiger Beweis für die Beteiligung von STEC an der Pathogenese steht allerdings noch aus. Bedeutung erhielt diese Vaskulopathie auch dadurch, dass sie als Tiermodell für die Erforschung von HUS verwendet werden konnte (FENWICK et CONWAN, 1998).

Hauskaninchen wurden ebenfalls als mögliche STEC-Ausscheider identifiziert (GARCÍA et FOX, 2003). Außerdem liegen Hinweise vor, dass STEC bei Kaninchen auch als Krankheitserreger eine Rolle spielen. GARCÍA et al. (2002) berichteten von einem Ausbruch, der klinisch durch Diarrhö und plötzliche Todesfälle gekennzeichnet war. Bei einem der drei betroffenen Tiere konnte ein *stx1*- und *eae*- positiver *E. coli*

O157:H- isoliert werden; bei zwei Tieren ließen sich zusätzlich noch EPEC-Isolate gewinnen. Bemerkenswert waren die histopathologischen Befunde, die starke Ähnlichkeit zum HUS-Geschehen beim Menschen aufwiesen, so dass auch Kaninchen als Tiermodell zur Erforschung von systemischen EHEC-Erkrankungen dienen könnten.

2.3.6.3 Bedeutung der STEC bei Wild- und Zoosäugetiere

Auch bei Wildtieren liegen Berichte über den Nachweis von STEC O157 und non STEC O157 vor (BÜLTE et WROCKLAGE, 1992).

Im Zusammenhang mit einem EHEC-O157-Ausbruch unter Besuchern eines Streichelzoos konnte als Erregerquelle Wildkaninchenkot, der sich im Bereich eines Kinderspielplatz- und Picknick-Areals befand, ermittelt werden. Man vermutet, dass die Kaninchen sich bei den angrenzend gehaltenen Rindern infizierten. In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass *E. coli* O157-Stämme in Kaninchenfäzes neun Monate persistieren können (BAILEY et al., 2002).

Vereinzelt liegen auch Berichte über den Nachweis von STEC-Stämmen bei Zootieren vor: man fand *E. coli* O157:H7 bei zwei Primaten und bei drei weiteren Affen ebenfalls *E. coli* O157, die man aber dann aufgrund ihres Virulenzprofils den EPEC zuordnete (BAUWENS et al., 2000).

2.3.7 Maßnahmen im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens

Das Robert-Koch-Institut beschrieb in seinem Epidemiologischen Bulletin vom 13. Oktober 2006 folgende Situation:

„[...] Die bakteriell bedingten Gastroenteritiden gehören zu den häufigsten nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) gemeldeten Infektionskrankheiten. Ihr Anteil beträgt insgesamt fast zwei Drittel aller an das RKI übermittelten Erkrankungsfälle. Die tatsächliche Häufigkeit dieser Erkrankungen ist allerdings nicht genau bekannt: Viele Erkrankte suchen bei leichten und kurzen Krankheitsverläufen keinen Arzt auf, viele Erkrankungen werden ätiologisch nicht geklärt und nicht alle diagnostizierten Erkrankungsfälle werden gemeldet. Ein durch zunehmenden Kostendruck im Gesundheitswesen verursachter Rückgang bei den Arztkonsultationen oder bei der mikrobiologischen Diagnostik bei Durchfallerkrankungen kann zu einer Verringerung der Meldezahlen führen und die Interpretation von Zeittrends erschweren. Nur durch eine adäquate Surveillance werden Ausbrüche frühzeitig erkannt und können gezielte Präventionsmaßnahmen eingeleitet werden; [...]. Methoden und Maßnahmen zur Erforschung, Prävention und Bekämpfung der durch Lebensmittel übertragenen gastrointestinalen Erkrankungen müssen auf nationaler wie internationaler Ebene kontinuierlich erprobt, evaluiert und weiter entwickelt werden. [...].“ (RKI, 2006)

Der Forderung des RKI nach Verbesserung der Surveillance zur genaueren Kenntnis der epidemiologischen Situation kommen die einzelnen Bundesländer auf verschiedenen Wegen nach:

In Bayern z. B. werden jährlich im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung zwischen 1.000 und 1.500 Lebensmittelproben tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie Umgebungsproben in der Routinediagnostik auf EHEC bzw. STEC untersucht (MESSELHÄUSSER, 2007). Im Jahre 2006 wurden darüber hinaus am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) 3862 Proben insgesamt, darunter Stuhlproben, Oberflächenwasserproben, Trinkwasserproben, Lebensmittelproben, Milchproben und Tierkotproben auf das Vorliegen von EHEC geprüft (SCHREIBER et al., 2007).

Neben einer weltweit zunehmend intensivierten Surveillance wird außerdem über die Entwicklung von humanen Impfstoffen zur HC- und HUS-Prävention geforscht. So gibt es positive Berichte über transkutane Immunisierung von Kaninchen mit der Untereinheit B des Shigatoxin 1 (ZHU et al., 2008) und über intranasale Impfungen mit der B-Untereinheit von Shigatoxin 2 (TSUJI et al., 2008). Ob diese Impfstoffe in

absehbarer Zeit auf den Markt kommen und sich gegebenenfalls durchsetzen können, bleibt jedoch 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 für den Menschen gerade auch für Risikogruppen eine überlegenswerte Maßnahme dar (MESSELHÄUSSER et al., 2005).

Im Bereich der Veterinärmedizin ist die Forschung bereits einen Schritt weiter: so hat im Herbst 2008 der weltweit erste Impfstoff zur Verringerung der Verbreitung von *Escherichia coli* O157:H7 durch Rinder, Econiche™, von der Canadian Food Inspection Agency (CFIA) eine umfassende Lizenzgenehmigung erhalten. Dieser Impfstoff entstand als Gemeinschaftsprojekt der University of British Columbia, der Vaccine and Infections Diseases Organization (VIDO) der University of Saskatchewan und des Alberta Research Councils (BIONICHE LIFE SCIENCES INC., 2008). Laut SMITH et al. (2008) reduziert der Impfstoff die Wahrscheinlichkeit der umweltbedingten Übertragung von *E. coli* O157:H7 innerhalb kommerzieller Rinderzuchten.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt der nächsten Jahre wird die genauere Identifizierung der Pathogenitätsfaktoren sein. 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 (MESSELHÄUSSER et al., 2005).

Auf humanmedizinischem Sektor bemüht man sich des Weiteren, 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).

2.3.8 Rechtliche Grundlagen

Entsprechend der von STEC/EHEC ausgehenden Gefahren finden sich in den jeweiligen Rechtsnormen entsprechende Vorgaben und Vorkehrungen.

Im „**Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen**“ (IfSG), ist die Meldepflicht im Falle einer EHEC-Erkrankung verankert. Gemäß § 6, Abs. 1, 1f ist der Krankheitsverdacht, die Erkrankung und der Tod an enteropathischem HUS namentlich zu melden. Die Meldung im Falle eines Krankheitsverdachts wird von BALES et al. (2003) damit begründet, dass der Erregernachweis oft erst relativ spät erfolgt oder nicht mehr möglich ist. Die frühe Meldung ermöglicht aber ein schnelles Auffinden der Infektionsquelle.

Neben dieser Regelung ist auch der direkte oder indirekte Nachweis von „*Escherichia coli*, enterohämorrhagische Stämme (EHEC) namentlich meldepflichtig (§ 7, Abs.1, 12b, IfSG), wobei der Nachweis primär auf menschliches Untersuchungsmaterial bezogen ist. Eine Meldepflicht für den Nachweis in sonstigem Material, also z. B. Kot von Nutztieren, gilt nur dann, wenn ein direkter Zusammenhang zwischen dem positiv befundeten sonstigen Material und einer konkreten akuten Erkrankung eines Menschen hergestellt werden kann (BALES et al., 2003)

Wie bereits in Kapitel 2.3 erwähnt dienen als Orientierung zur Weitergabe von Daten von den Gesundheitsämtern an die zuständige Landesbehörde und von dort an das RKI die Falldefinitionen des RKI (RKI, 2007).

Des Weiteren finden sich im IfSG Rechtsvorgaben, die der Vorbeugung einer Infektion durch Mensch-Mensch-Kontakt oder einer Kontamination von Lebensmitteln dienen: § 34, Abs. 1, IfSG verbietet an EHEC erkrankten Personen oder der Erkrankung verdächtigen Personen für die Dauer der Ausscheidung die Ausübung von Lehr-, Erziehungs-, Pflege-, Aufsichts- oder sonstigen Tätigkeiten in Gemeinschaftseinrichtungen, bei denen sie Kontakt zu den betreuten Personen haben. Auch dürfen nach § 42, IfSG, EHEC-ausscheidende Personen nicht beim Herstellen, Behandeln oder in Verkehr bringen bestimmter in § 42 Abs. 1, IfSG gelisteter Lebensmittel tätig sein oder beschäftigt sein.

Ebenfalls unter dem Aspekt des Infektionsschutzes sind die Vorgaben der **Trinkwasserverordnung** (TrinkwV) von 2001 zu sehen, deren Zweck der Schutz der menschlichen Gesundheit ist (§ 1, TrinkwV).

Da Kolibakterien aufgrund ihres Habitats eine wichtige Rolle als Indikatorkeime für frische fäkale Kontamination spielen, dürfen sie in 100 ml Trinkwasser nicht nachweisbar sein (Anlage 1 zu § 5, Abs. 2 und 3, TrinkwV). Zwar finden sich in dieser Verordnung keine explizit verankerten Messgrößen für STEC/EHEC, jedoch können die Gesundheitsämter im Bedarfsfall Untersuchungen auf enteropathogene *E. coli* anordnen (§ 20, Abs. 1, Nr. 4).

Gütekriterien für Badegewässer finden sich in der **RL 2006/7/EG**, in der ebenfalls Grenzwerte für *E. coli* angegeben sind. Je nach Qualitätseinstufung dürfen in Binnengewässern 500-1000 KbE *E. coli* pro 100 ml Wasser nachgewiesen werden.

Auch im deutschen Tierseuchenrecht sind die STEC gelistet:

Die „Verotoxin bildende *Escherichia coli*“ sind in Anlage 2 der **Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten** aufgeführt und zählen somit zu den Tierkrankheiten bzw. Erregern, die gemäß § 1, Abs. 1 und 2 dieser Verordnung vom Leiter des Veterinäruntersuchungsamtes, des Tiergesundheitsamtes oder sonstiger öffentlicher oder privater Untersuchungsstellen oder vom behandelnden Tierarzt unverzüglich unter Angabe von Datum, Tierart und Ort gemeldet werden müssen.

Wie bereits erwähnt stellen Lebensmittel die Hauptinfektionsquelle von STEC für den Menschen dar und somit ist natürlich die lebensmittelrechtliche Beurteilung ebenfalls von großem Interesse.

Grundsätzlich darf nach aktuellem Recht ein Lebensmittel keine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Artikel 14 der **VO (EG) 178/2002** und § 5 **LFGB** drücken dies wie folgt aus: „*Es ist verboten, Lebensmittel für andere derart herzustellen oder zu behandeln, dass ihr Verzehr gesundheitsschädlich ... ist.*“ (§ 5, Abs. 1, LFGB) bzw. „*Lebensmittel, die nicht sicher sind, dürfen nicht in den Verkehr gebracht werden*“ (VO (EG) 178/2002 Art. 14, Abs. 1).

Ein Lebensmittel gilt dann als nicht sicher, wenn davon auszugehen ist, dass es gesundheitsschädlich ist (Art. 14, Abs. 2, VO (EG) 178/2002).

Im Falle eines STEC-Nachweises in Lebensmitteln stellt sich bei der rechtlichen Beurteilung die Frage nach der „Sicherheit“ und somit „Verkehrsfähigkeit“ des Produkts gemäß Art. 14, Abs. 1, VO (EG) 178/2002. Zu berücksichtigen ist hierbei einmal, ob das Produkt gesundheitsschädlich im Sinne des Art. 14, Abs.2a, VO 178/2002 in Verbindung mit Art. 14, Abs. 4a-c, VO 178/2002) ist und welcher Verwendung der Verbraucher das Lebensmittel unter normalen Bedingungen zuführt, bzw. ob er über eine angemessene Kenntlichmachung derart informiert wird, dass kein Risiko durch unsachgemäße Verwendung wie z. B. Rohverzehr von zum

durcherhitzen vorgesehenen Hackfleisch besteht (Art. 14, Abs. 3a, VO (EG) 178/2002).

Dies berücksichtigt auch ein ALTS-Beschluss aus dem Jahre 2001: dieser legte nämlich fest, dass eine Beurteilung nach § 8 LMBG (jetzt Art. 14, Abs.2a, VO (EG) 178/2002) möglich ist, wenn ein **positiver Erregernachweis** mit PCR- bzw. Real-Time-PCR und kultureller Nachweis gelingt (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, L07-18-1, 2002) **und** es sich um ein **verzehrfertiges** Lebensmittel handelt.

Wird der Keim in einem rohen Lebensmittel nachgewiesen, das vor dem Verzehr durcherhitzt wird, wird dieses als „gesundheitsschädlich“ bzw. „nicht sicher“ im **rohen** Zustand gemäß Art. 1, Abs. 1 in Verbindung mit Art. 14, Abs. 2a, VO (EG) 178/2002 eingestuft.

Der ALTS hat im Jahr zuvor noch einen weiteren Beurteilungsvorschlag erarbeitet, bei dem die Beurteilung des Lebensmittels abhängig ist vom Verwendungszweck bzw. der Verbraucherzielgruppe des Produkts (s. Tab. 2.7).

Tab 2.7: ALTS-Vorschlag zur Beurteilung von VTEC in Lebensmitteln (modifiziert nach BÜLTE, 2000)

Lebensmittelkategorie	Lebensmittelrechtliche Beurteilung beim Nachweis von	
	EHEC ¹⁾	VTEC ²⁾
Lebensmittel für Risikogruppen wie Säuglinge und Kleinkinder	§ 5 LFGB ³⁾	§ 5 LFGB ³⁾
rohe Lebensmittel, nach vorhersehbarem und bestimmungsgemäßen Gebrauch vor Verzehr erhitzt	§11 (2) 1 LFGB ³⁾	keine Beanstandung
verzehrfähige Lebensmittel aller anderen Kategorien	§11 (2) 1 LFGB	§ 11 (2) 1 LFGB

¹⁾ Verotoxin-bildende *E.-coli*-Stämme mit *E. coli* attaching and effacing (*eae*)-Gen

²⁾ Vertotoxinbildende *E.-coli*-Stämme ohne *eae*-Gen

³⁾ Lebensmittel- und Futtermittel- Gesetzbuch

Neben den Vorgaben zur Beurteilung von Lebensmitteln legt eine weitere Rechtsvorschrift, die **VO (EG) 2073/2005**, mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel fest und richtet sich ganz gezielt an die Gruppe der Lebensmittelunternehmer, die hauptverantwortlich für die Sicherheit eines Lebensmittels sind (VO (EG) 852/2004, Art. 1, Abs.1a).

Gemäß Art. 3, Abs. 1, VO (EG) 178/2002 hat der Lebensmittelunternehmer dafür Sorge zu tragen, dass die mikrobiologischen Kriterien des Anhang 1 der VO (EG) 2073/2005 eingehalten werden und entsprechende Maßnahmen hierzu zu treffen. Die Verordnung unterscheidet zwischen Lebensmittelsicherheitskriterien und Prozesshygienekriterien, wobei letztere für die verschiedenen Gruppen von Lebensmittelerzeugnissen separat festgelegt sind. *E. coli* spielt in diesem Zusammenhang als Indikator für eine Fäkalkontamination eine wichtige Rolle und Grenzwerte sind dezidiert festgelegt.

STEC/EHEC werden nicht direkt namentlich erwähnt. In ihrer Erwägung der Gründe zur Erlassung dieser Verordnung beruft sich die Kommission der Europäischen Gemeinschaften auf eine Stellungnahme des Wissenschaftlichen Ausschusses „Veterinärmaßnahmen im Zusammenhang mit der öffentlichen Gesundheit“ (SCVPH) vom 21. und 22. Januar 2003: der Ausschuss hielt es hiernach nicht für angemessen, mikrobiologische Standards für verotoxinbildende *Escherichia coli* (VTEC) im Allgemeinen oder VTEC der Serogruppe O157 im Besonderen festzusetzen. Aufgrund des nur sporadischen Vorkommens und der geringen Prävalenz von VTEC O157 in Risikolebensmitteln würde die Etablierung von entsprechenden Standards nach Meinung des Ausschusses nicht zu einer bedeutenden Reduktion des damit verbundenen Risikos für den Verbraucher führen. Vielmehr könnten mikrobiologische Richtwerte und Korrekturmaßnahmen, welche auf die Reduktion fäkaler Kontamination entlang der Lebensmittelkette abzielen, zu einer Reduktion gesundheitlicher Risiken inklusive der humanpathogenen VTEC führen.

Jedoch bleibt es das Recht der zuständigen Behörde, *„weitere Probennahmen und Untersuchungen im Rahmen von Prozesskontrollen in Fällen, in denen der Verdacht besteht, dass Lebensmittel nicht unbedenklich sind, oder im Zusammenhang mit einer Risikoanalyse durchzuführen, um andere **Mikroorganismen**, deren **Toxine** oder **Metaboliten** nachzuweisen oder zu messen“* (Art.1, Abs. 1, Satz 2, VO (EG) 2073/2005).

2.4 Nachweisverfahren für STEC/EHEC

Da die ersten bekannt gewordenen EHEC-Ausbrüche auf den Serotyp O157:H7 zurück zu führen sind (RILEY et al., 1983; CARTER et al., 1987, MORGAN et al., 1988), konzentrierten sich die Arbeiten zur Etablierung geeigneter Nachweisverfahren zunächst auf diesen Serotyp. Schnell wurden biochemische Besonderheiten bei diesen Stämmen entdeckt, aufgrund derer sie mittels einfacher kultureller Verfahren von anderen *E. coli* differenziert werden konnten (WELLS et al., 1983). Mittlerweile ist das Shigatoxin-Bildungsvermögen für etliche weitere Serovare beschrieben, so dass die Fokussierung auf bestimmte Serogruppen nicht den realen Anforderungen an die Diagnostik entspricht. Dass trotzdem eine Vielzahl der in der Anwendung oder sogar Neuentwicklung befindlichen Nachweismethoden sich auf die Serogruppe O157 beschränkt, wird oftmals mit der unterschiedlichen regionalen Bedeutung der einzelnen Serogruppen begründet, insbesondere mit der Dominanz von *E. coli* O157-Stämmen in Nordamerika (WHO, 1998).

Die Abgrenzung der STEC von anderen *E.-coli*-Stämmen ist aufgrund fehlender biochemischer Gemeinsamkeit schwierig. Ein einfacher kultureller Nachweis mittels Selektivmedien ist somit nicht möglich. Einzige Gemeinsamkeit aller STEC ist die Fähigkeit zur Bildung von Shigatoxinen; Zielstruktur der Diagnostik ist also das Toxin selbst oder das dafür codierende Gen (FRUTH et al., 2002, BETTELHEIM et BEUTIN, 2003).

Im Folgenden werden die aktuell gängigen Nachweismethoden dargestellt, unterteilt nach phänotypischen und genotypischen Verfahren.

2.4.1 Phänotypische Nachweisverfahren

2.4.1.1 Zelltests

Hierbei handelt es sich um Zytotoxizitätstest unter Einsatz von Verozell-Kulturen. Erstmals beschrieben von KONOWALCHUK et al. im Jahre 1977 und namensgebend für dieses damals neuartige *E.-coli*-Zytotoxin (*Verotoxin*).

2.4.1.2 Kultivierung

Flüssige Nährmedien

Aufgrund der geringen minimal infektiösen Dosis bei EHEC-Erkrankungen und der oftmals nur geringgradigen STEC-Kontamination von Lebensmitteln ist die Vorschaltung einer selektiven Anreicherung notwendig. Für die Detektion insbesondere von *E. coli* O157 sind verschiedene Nährmedien beschrieben, die in Tabelle 2.8 zusammengefasst sind:

Tabelle 2.8: Ausgewählte Anreicherungsmedien zum Nachweis von STEC bzw. *E. coli* O157

Nährmedium	Akronym	Quelle
Brilliantgrün-Galle-Lactose-Bouillon	BRILA	MACKENZIE et al., 1948
modifizierte Trypton-Soja-Bouillon mit Novobiocin	mTSB+N	DOYLE et al., 1987
modifizierte <i>Escherichia coli</i> -Bouillon mit Novobiocin	mEC+N	OKREND et al., 1990

Feste Nährböden

Ausgehend von der Feststellung, dass *E. coli* O157:H7-Stämme kein Sorbitol fermentierten (WELLS et al., 1983, RATNAM et al., 1988), modifizierte man zur Untersuchung von Stuhlkulturen den bewährten **MacConkey-Agar**, indem man Laktose durch Sorbitol ersetzte. Hieraus resultierte das neue Differentialmedium **SMAC** (MARCH et RATNAM, 1986). Durch Zusatz von Cefixim und Tellurit erreichte man in dem Medium CT-SMAC eine deutliche Unterdrückung der Begleitflora (ZADIK et al., 1993). Dem hohen Anteil falsch positiver Isolate bei Anzüchtung auf SMAC konnte so begegnet werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass sich auf **CT-SMAC** wiederum Tellurit-sensitive *E. coli* O157-Stämme (insbesondere sorbitolfermentierende *E. coli* O157:H-) nicht vermehren konnten (KARCH et BIELASZEWSKA, 2001). CT-SMAC gilt mittlerweile als das gebräuchteste Isolationsmedium, sollte aber aufgrund genannter Nachteile immer gemeinsam mit einem zweiten Selektivmedium mit anderem Nachweisprinzip zum Einsatz kommen (HECKÖTTER, 1999, DE BOER et HEUVELINK, 2000).

Fluorogene Nährmedien, wie der Hemorrhagic Colitis-(HC-) Agar nach SZABO (1986) basieren neben der Sorbitmetabolisierung noch auf einer zweiten Schlüsselreaktion: der im Gegensatz zu *E. coli* fehlenden β -Glucuronidase-Aktivität bei O157:H7-Stämmen (RATNAM et al., 1988).

Der Nachweis erfolgt über das fluorogene Substrat 4-Methyl-umbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG). In Inokulationsversuchen war bei niedriger Einmischkonzentration und kurzer Bebrütungszeit (6 h) der HC-Agar dem CT-SMAC-Agar überlegen, nach 24stündiger Bebrütung war jedoch die Auswertbarkeit durch überwiegende Begleitflora stark eingeschränkt (HECKÖTTER, 1999).

Eine Weiterentwicklung stellen die **chromogenen Nährmedien** dar, die neben Sorbit als Marker auch chromogene Substrate für β -G-Glucuronidase und/oder β -D-Galactosidase anbieten.

2.4.1.3 Immunologische Nachweisverfahren

Immunomagnetische Separation (IMS)

Grundprinzip der IMS ist die Bindung von (Bakterien-)Zellen mittels spezifischer Antikörper an magnetische Partikel, wonach sie durch Anlegen eines magnetischen Feldes aus einer heterogenen Suspension isoliert werden können. Die IMS ist somit nicht als Detektionssystem, sondern vielmehr als selektiver Anreicherungsschritt zu verstehen. Anwendung findet dieses Verfahren in Zytologie und Mikrobiologie und war in der Amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG aufgenommen (L 00.00-68, 2002). Verschiedene immunomagnetische Partikel sind kommerziell erhältlich (CUDJOE et al., 1993).

In zahlreichen Untersuchungen hat sich die IMS als schnelles, routinetaugliches Verfahren zur Isolation von *E. coli* O157 aus Lebensmitteln, insbesondere Rinderhackfleisch, sowie Stuhl- und Kotproben erwiesen (FRATAMICO et al., 1992, WRIGHT et al., 1994, KARCH et al., 1996, HECKÖTTER, 1999, BOPP et al., 2003).

Die Selektivität des *E. coli* O157-Nachweises in Rinderhackfleisch konnte in Untersuchungen von WRIGHT et al. (1994) um den Faktor 100 gesteigert werden.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) / Enzymimmunassay (EIA)

Der immunologische Nachweis von Verotoxin mittels EIA bzw. ELISA eignet sich als Screeningverfahren zur Serovar-unabhängigen Erfassung von STEC und hat sich aufgrund seiner einfachen Handhabung in der Routinediagnostik etabliert (HESS et al., 1999, BETTELHEIM et al., 2003).

Immunoblot

Der Immunoblot dient der gezielten, Serovar-unabhängigen Isolierung von STEC-Stämmen. Die Erreger-Isolierung dient nicht nur der Absicherung des Screening-Ergebnisses, sondern ermöglicht auch die weitergehende Charakterisierung des Isolats, welche zur lebensmittelrechtlichen Beurteilung und/oder epidemiologischen Aufklärung notwendig ist (GOLL, 2005).

Immunochromatographische Lateral flow-Tests

Zu dieser Gruppe zählen der in dieser Arbeit verwendete Singlepath® *E. coli* O157 und der Duopath® Verotoxins (Fa. MERCK, Darmstadt).

Auf beide Verfahren wird in den folgenden Kapiteln noch dezidiert eingegangen.

2.4.2 Genotypische Nachweisverfahren

Aufgrund der geänderten epidemiologischen Situation und der zunehmenden Bedeutung der genauen Kenntnis des vorliegenden Genotyps ist eine Untersuchung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. Hybridisierung gängig geworden.

2.4.2.1 Koloniehybridisierung

Ähnlich wie beim Immunoblot werden bei der **Koloniehybridisierung** die gesuchten Kolonien über ein Membranverfahren detektiert, wobei anstelle von Antikörpern DNA-Sonden zum Einsatz kommen.

Die DNA-DNA-Hybridisierung eignet sich nicht nur zum qualitativen Nachweis von STEC, sondern auch zur quantitativen Erfassung (STAHL et BÜLTE, 2000b).

2.4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Möglichkeit der schnellen und gezielten Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels **PCR**-Technik hat - nicht nur in der STEC/EHEC-Diagnostik - zahlreiche Anwendungsgebiete eröffnet. Wurde sie früher v. a. als Bestätigungsreaktion im Anschluss an die kulturelle Isolierung sowie zur Charakterisierung und Typisierung der erhaltenen Isolate eingesetzt, rückt nun immer mehr die Anwendung als direktes

Detektionssystem in den Vordergrund. Problematisch erscheint hierbei die mögliche Miterfassung nicht-lebensfähiger Zellen, die Anwesenheit inhibierender Substanzen in der Probenmatrix sowie die fehlende Isolierung der detektierten Organismen (OLSEN et al., 1995; BÜLTE et al., 1998; LÜCKE und TEN BOSCH, 1998). Die PCR kann als Screening-Methode zum Serovar-unabhängigen Nachweis von STEC/EHEC z. B. aus Lebensmittelanreicherungskulturen angewandt werden. Wenngleich diese Methode als sehr sensitives Verfahren gilt, ist eine vorgeschaltete Anreicherung unabdingbar, da nur so eine ausreichende Sensitivität gewährleistet werden kann (BÜLTE et al., 1998). Generell sollte ein positives PCR-Screening-Ergebnis durch ein zweites Verfahren ergänzt werden (BETTELHEIM et BEUTIN, 2003), wobei zur weiteren Charakterisierung die Erregerisolierung anzustreben ist (BÜLTE et al., 1998).

Neben der klassischen PCR-Methode wurde das sogenannte **Real-time-PCR** entwickelt, ein Verfahren zur Detektion der Amplifikate über DNA-bindende Fluoreszenz-Farbstoffe. Vorteil dieser Methodik ist zum einen, dass das Ergebnis zeitnah vorliegt und die PCR-Produkte quantifiziert werden können (GOLL, 2005).

Eine weitere PCR-Variante stellt das **RT-PCR** (Reverse Transcription-PCR) dar (MCINGVALE et al. 2002). Anstelle der vergleichsweise stabilen DNA, die auch nach dem Zelltod noch lange nachweisbar sein kann, wird messenger RNA (mRNA) detektiert. Diese ist weit weniger stabil und wird deshalb als Indikator für das Vorhandensein lebensfähiger Zellen angesehen (SHERIDAN et al., 1998).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Die Probenahme erfolgte im Zeitraum vom 10.10.2006 bis zum 15.02.2008 und belief sich auf eine Gesamtzahl von 102 Proben.

Tab. 3.1: Zeitraum und Anzahl der jeweils entnommen Proben in den Jahren 2006-2008

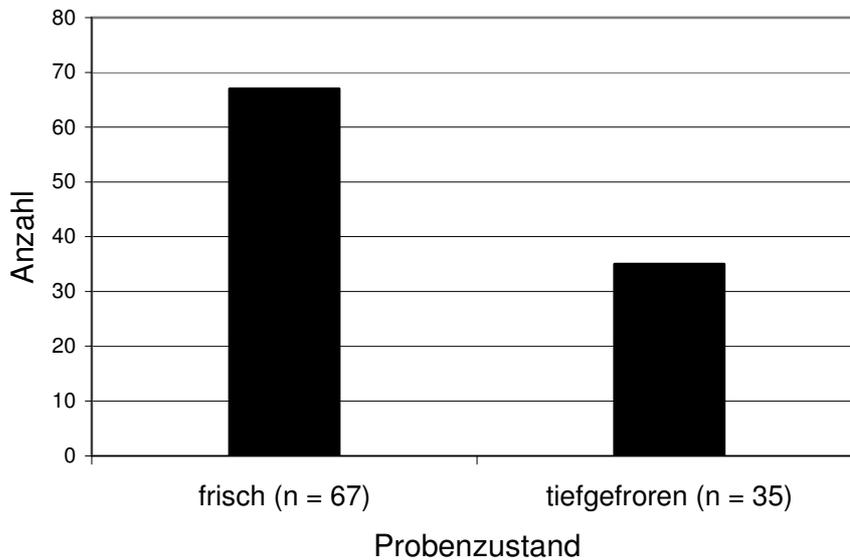
Zeitraum	Probenzahl/Jahr
Okt.-Dez. 2006	24
Feb.-Dez. 2007	58
Jan.-Feb. 2008	20
Gesamt	102

In 67 Fällen begann die Untersuchung der Proben noch am Tag der Probennahme: diese Proben werden in dieser Arbeit weiterhin als „frische Proben“ bezeichnet.

Die Untersuchung der übrigen 35 Proben erfolgte zeitversetzt zur Probennahme. In diesen Fällen handelte es sich entweder um im Handel als Tiefkühlware erhältliches Rinderhackfleisch, das unter Einhaltung der Kühlkette bei -18 °C im Tiefkühlfach gelagert wurde oder um gekühlte Proben, die unmittelbar nach der Probennahme bei -18 °C eingefroren wurden. Diese Proben werden im Folgenden als „tiefgefrorene Proben“ zusammengefasst.

Die Verteilung der Proben gemäß ihres Probenzustandes, also die Verteilung auf frische und tiefgefrorene Proben, stellt sich wie folgt dar:

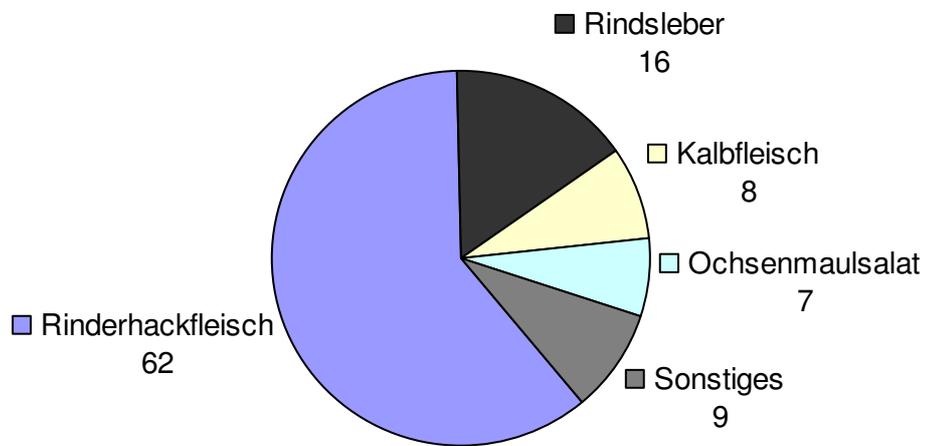
Abb. 3.1: Anzahl frischer Proben und tiefgefrorener Proben



Es handelte sich um Rindfleischprodukte/-teilstücke folgender Art:

- Rinderhackfleisch, roh (n = 62)
- Rinderleber, roh (n = 16)
- Kalbfleisch, roh (n = 8)
- Sonstiges (n = 9): Ochsenmaulsalat (n = 7), Roastbeef (5), Beinscheibe Rind, roh (2), Rinderhals, roh (1), gemischtes Hackfleisch, roh (1)

Abb. 3.2: Verteilung der Rindfleischprodukte/-teilstücke:



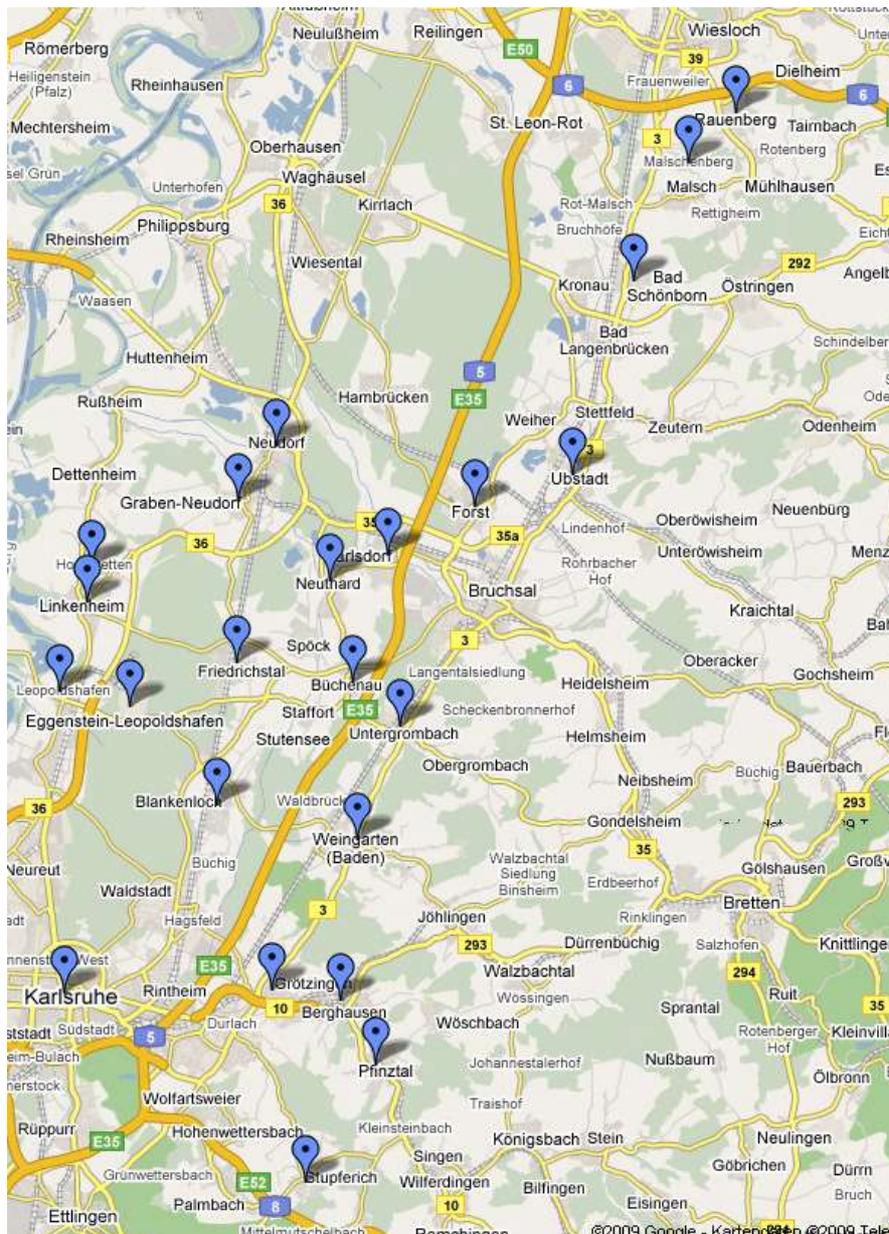
Alle Fleischproben stammen von Rindern, die in Deutschland geboren, aufgezogen und geschlachtet wurden.

3.2 Beprobte Betriebe

Die 102 Proben stammten aus 38 verschiedenen Metzgereien und Supermärkten im Landkreis Karlsruhe und Landkreis Rhein-Neckar-Kreis (s. Abb. 3.1).

Zum Teil erfolgte die Probennahme in unterschiedlichen Geschäften derselben Ortschaft. Einige Betriebe wurden im Untersuchungszeitraum mehrfach beprobt.

Abb. 3.3: Übersichtskarte der Region

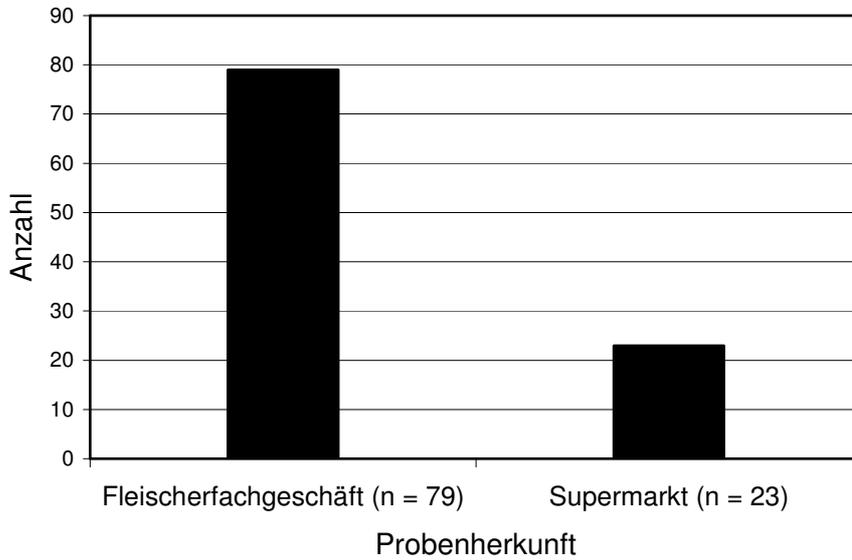


Orte, in denen sich die beprobten Betriebe befanden:

Bad Schönborn,
 Berghausen,
 Büchenau,
 Eggenstein-Leopoldshafen
 Forst,
 Graben-Neudorf,
 Grötzingen,
 Karlsdorf,
 Karlsruhe,
 Langenbrücken,
 Linkenheim-Hochstetten,
 Malschenberg,
 Rauenberg,
 Söllingen,
 Stupferich,
 Stutensee,
 Untergrombach,
 Ubstadt,
 Weingarten

79 Proben stammten aus Fleischerfachgeschäften, in 23 Fällen erfolgte die Probennahme in Supermärkten (s. Abb. 3.4)

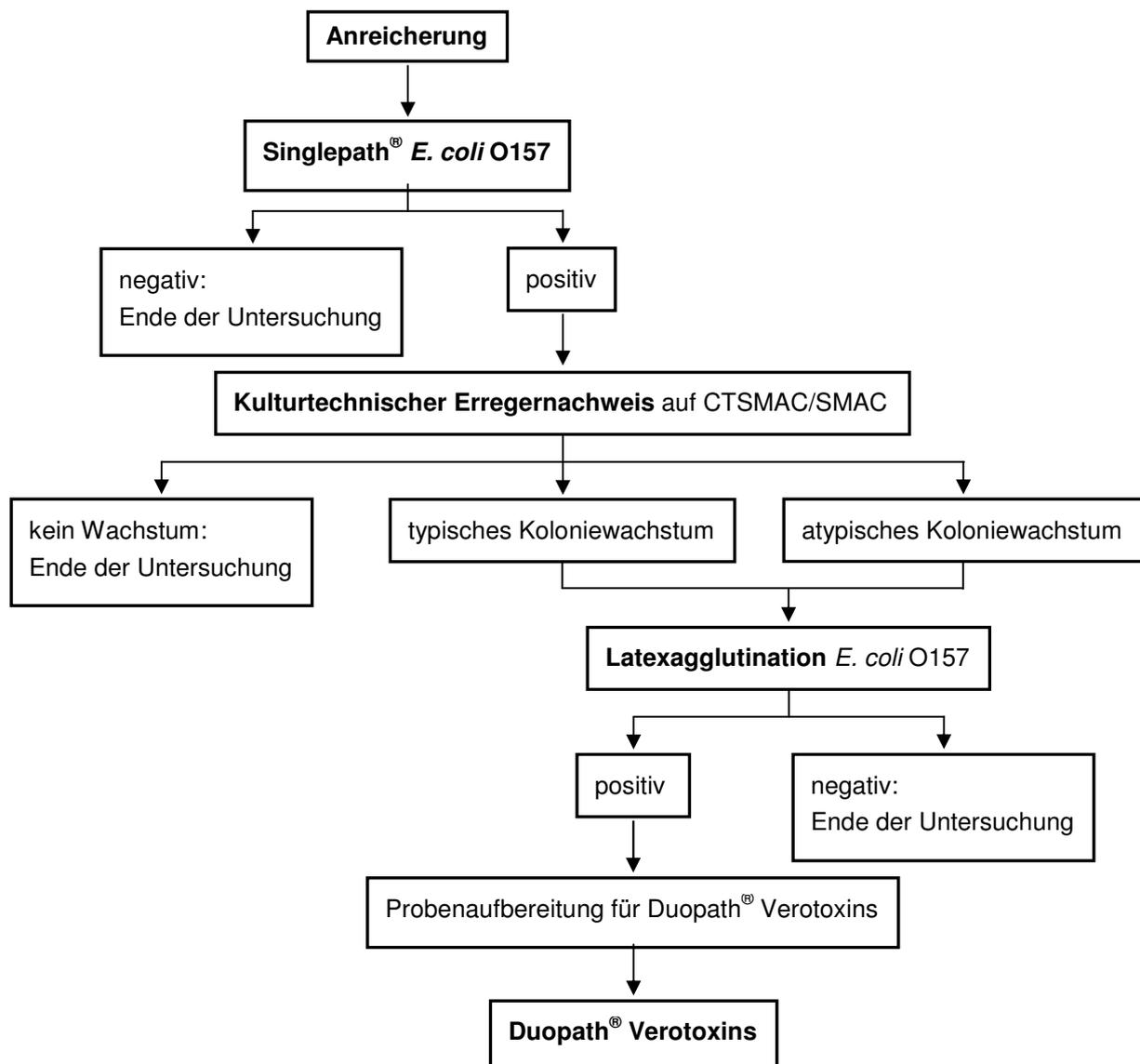
Abb. 3.4: Herkunft der Proben



3.3 Probenuntersuchung

Die Probenuntersuchung erfolgte in den Räumlichkeiten und mit den Gerätschaften der Karlsruher Fächer GmbH, Abteilung Karlsruher Hygiene Labor, Durlacher Allee 62, 76131 Karlsruhe; 2007 akkreditiert durch die Staatliche Anerkennungsstelle der Lebensmittelüberwachung (SAL), Wiesbaden: SAL-BW-G 040-03-05 gemäß DIN EN/IEC 17025:2005 („Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien“).

Abb. 3.5: Flussdiagramm zur Darstellung des gesamten Untersuchungsablaufs



3.3.1 Vorbereitung

3.3.1.1 Tiefgekühlte Proben

Diese Proben wurden 24 Stunden vor Analysebeginn der Tiefkühlung entnommen und unter ständiger Kühlung bei + 8°C aufgetaut.

3.3.1.2 Anreicherung

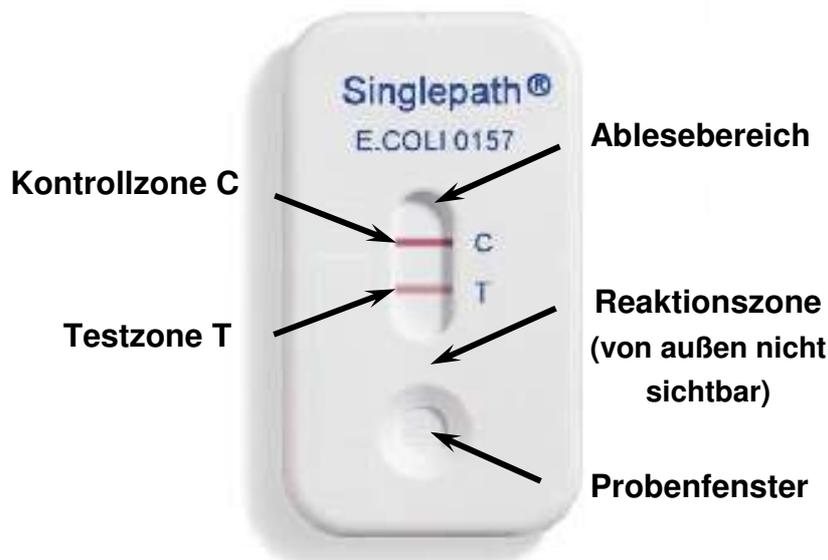
25 g des Probenmaterials wurden in 225 ml **mEC + Novobiocin Selektiv Supplement** (Herstellung: Anhang, Kapitel 8.1.2.1) überführt und mit dem Stomacher bei einer Frequenz von 180/min⁻¹ homogenisiert. Diese Suspensionen wurden 18-24 h bei + 35 bis 37 °C aerob inkubiert und dann für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen verwendet.

3.3.2 Singlepath[®] *E. coli* O157, Fa. MERCK

Der Singlepath[®] *E. coli* O157 ist ein Testsystem, das für den präsumtiven qualitativen Nachweis von *E. coli* O157 inklusive des Serovars H7 aus verschiedenen Lebensmittel- und Umweltproben nach Herstellerangaben vorgesehen ist. Es handelt sich um einen immunologischen Schnelltest, der zeit- und personalaufwendige Arbeitsschritte vermeidet.

Der Test wurde im Mai 2004 durch das AOAC Research Institute für die Untersuchung von rohem Hackfleisch und pasteurisierter Milch validiert (Zertifikat s. Anhang).

3.3.2.1 Testprinzip

Abb. 3.6: Singlepath® *E. coli* O157, Testsimplet

Der Singlepath® *E. coli* der Fa. MERCK (s. Abb. 3.6) zählt aufgrund seines Funktionsprinzips (s. Abb. 3.7) zur Gruppe der Lateral-flow-Tests bzw. immunchromatographischen Lateral-flow-Tests, wobei der Nachweis von *E.-coli*-O157-Antigenen über Gold-markierte Antikörper erfolgt (gold labelled immunosorbent assay, **GLISA**).

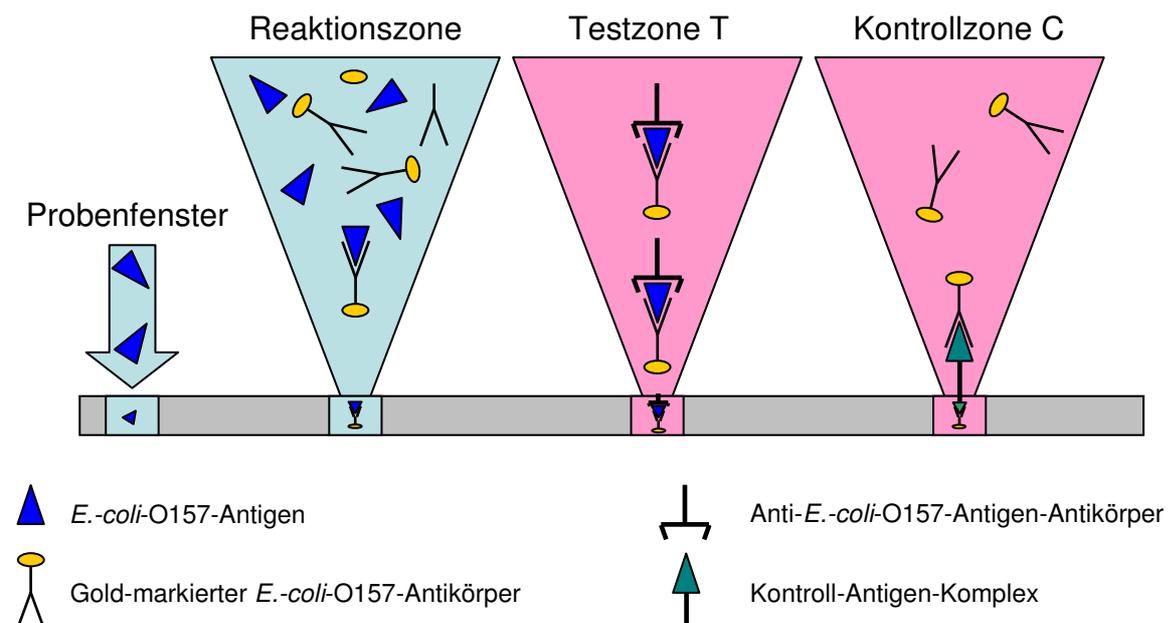
Für die Testdurchführung wurde eine definierte Menge (150 µl oder 5 Tropfen) der zuvor in mEC-Bouillon + Novobiocin angereicherten und homogenisierten Proben-suspension in das runde Probenfenster pipettiert. Aufgrund der Kapillarkräfte wird die Probensuspension über eine im Testsimplet eingearbeitete Nitrozellulosemembran gezogen und gelangt so als erstes zur von außen nicht sichtbaren Reaktionszone, in der sich hoch spezifische Antikörper gegen *E. coli* O157 befinden. Diese Antikörper sind an dem konservierten Teil (also dem der Bindungsstelle entgegengesetzten Ende) mit kolloidalen Goldpartikeln beladen. Im Falle von vorhandenem *E.-coli*-O157-Antigen in der Probe bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die mit der Probensuspension weiter auf der Nitrozellulose-Membran zur Testzone T fließen.

In dieser Testzone T ist ein zweiter Antikörper linienförmig aufgetragen, der sich gegen den goldmarkierten *E.-coli*-O157-Antigen-Antikörper richtet. Bindet nun der Antigen-Antikörper-Komplex an diesen Anti-Antikörper entsteht in der Testzone eine rot gefärbte waagrechte Linie, die das Vorhandensein von *E.-coli*-O157-Antigen anzeigt.

Die Rotfärbung ist auf die **LSPR** (localized surface plasmon resonance) der kolloidalen Goldpartikel zurückzuführen. Bei Plasmonen handelt es sich um elektromagnetische Oberflächenwellen, die sich parallel zu der Grenzfläche Metall/Luft ausbreiten. Die **Oberflächenplasmonenresonanz** (surface plasmon resonance, **SPR**) bezeichnet die Anregung von Oberflächenplasmonen durch Licht und bezieht sich auf plane Oberflächen, während die LSPR sich auf metallische Strukturen mit Größen im Nanometerbereich bezieht. Goldpartikel im Größenbereich von 20-120 nm ergeben typischerweise ein rotes Farbsignal (SLAGHUIS, persönliche Mitteilung; CHENG et CHAU, 2003; LAI et al., 2007).

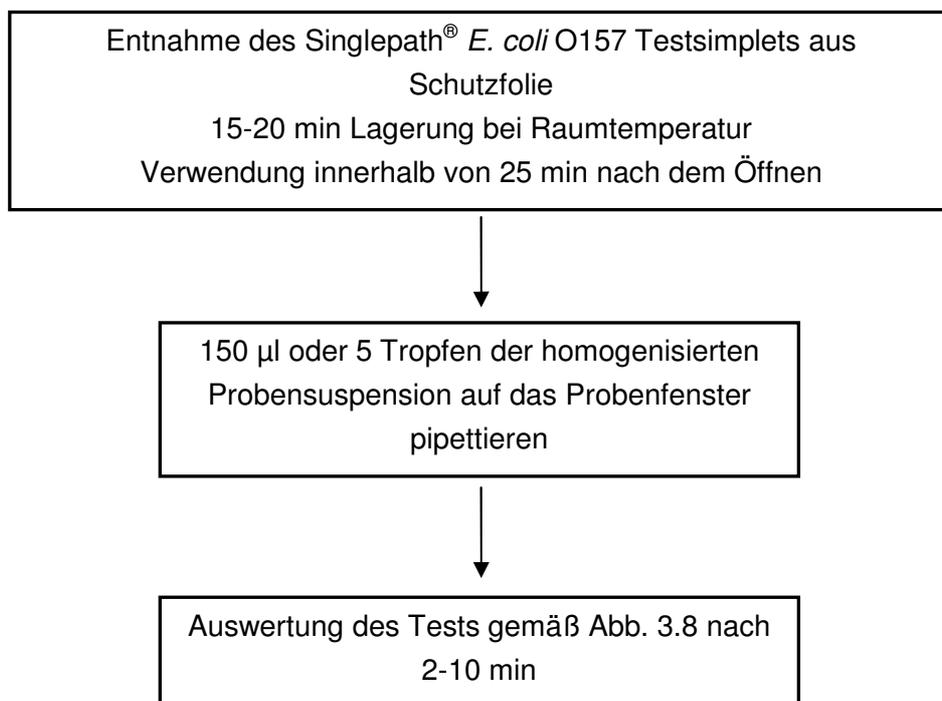
Als nächstes erreicht die Probe die Kontrollzone C, in der alle goldmarkierten Antikörper, die nicht mit *E.-coli*-O157-Antigen beladen sind, ebenfalls linienförmig gebunden werden und eine weitere rote Linie ausbilden. Diese Linie zeigte das korrekte Funktionieren des Tests an und war somit unerlässlich für die Interpretation des Ergebnisses.

Abb. 3.7: Funktionsprinzip eines GLISA am Beispiel des Singlepath® *E. coli* O157



Zur Untersuchung der Probe mit dem Singlepath® *E. coli* O157 wurde dieser 15-20 min vor seiner Verwendung aus dem Kühlschrank entnommen und in seiner Schutzfolie der Raumtemperatur angeglichen. Nach dieser Zeit wurden die Testsimplen aus ihrer Schutzfolie entnommen, auf eine plane Unterlage gelegt, mit der zugehörigen Labornummer beschriftet und unmittelbar, spätestens aber nach 25 Minuten mit der homogenisierten und angereicherten Probenlösung bestückt. Bereits nach 2- 5 Minuten zeigte sich im Ablesebereich des Testsimplen eine Anfärbung der Kontrollzone C und im Falle positiver Proben eine schwach bis kräftig rosafarbene Linie in der Testzone T. Das endgültige Ergebnis wurde 10-20 Minuten nach Testdurchführung abgelesen (s. Abb. 3.7).

Abb. 3.7: Flussdiagramm zur Durchführung des Singlepath® *E. coli* O157

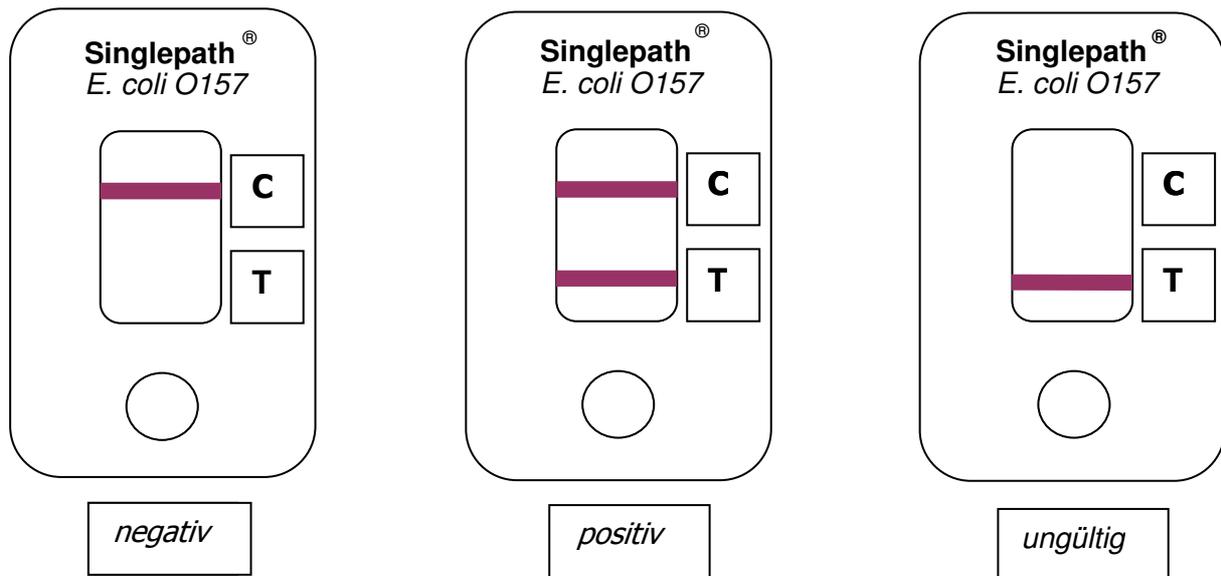


3.3.2.2 Auswertung des Testergebnisses

Wie in Kapitel 3.3.2.1 erläutert, zeigte eine rosafarbene Linie in der Kontrollzone C das korrekte Funktionieren des Tests an. Nur in diesem Fall wurde der Singlepath® *E. coli* O157 ausgewertet, andernfalls wurde er als ungültig verworfen und die Untersuchung mit einem neuen Testsimplet wiederholt.

Zeigte sich eine weitere rosafarbene Linie in der Testzone T, wurde das Testergebnis als positiv interpretiert. Berücksichtigung fand die die Angabe des Herstellers, dass auch eine schwach rosafarbene Linie in der Testzone T als positives Ergebnis zu werten sei.

Abb. 3.8: Ergebnisauswertung des Singlepath® *E. coli* O157



3.3.2.3 Verifikation

Im Falle eines positiven Ergebnisses im Singlepath® *E. coli* O157 wurden direkt im Anschluss je 1-2 Impfösen der Anreicherungsflüssigkeit der jeweiligen Probe auf CT-SMAC-Agar (Zubereitung s. Anhang, Kapitel 8.1.2.2) ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Die makroskopische Beurteilung der Kolonien erfolgte am darauffolgenden Tag gemäß der in Tabelle 3.2 aufgelisteten Kriterien.

Tab. 3.2: Koloniemorphologie von *E. coli* O157 bei Anzucht auf CT-SMAC

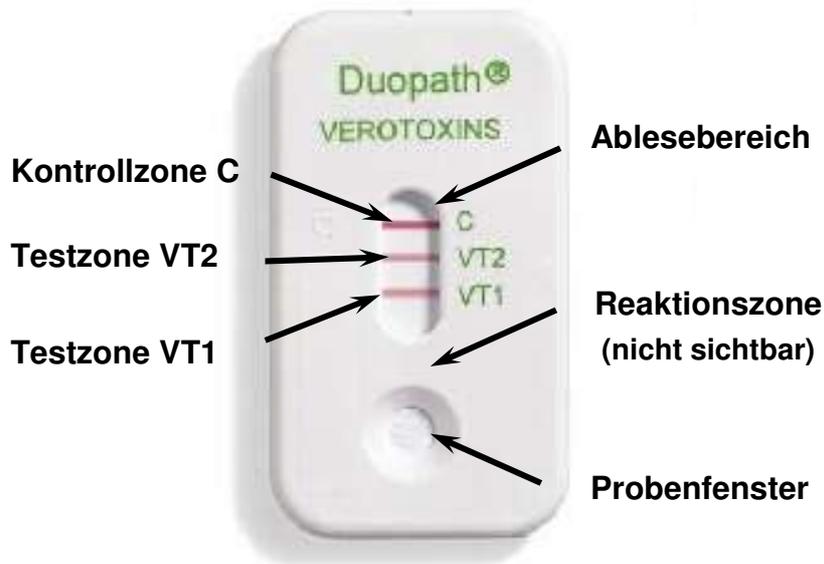
Agar	Koloniemorphologie
CT-SMAC / SMAC	Typische Kolonien: klein (ca. 1-2 mm), rund, transparent, glänzend
CT-SMAC / SMAC	Atypische Kolonien: klein (ca. 1-2 mm), rund, rot/pink

Kolonien, die gemäß Tabelle 3.2 als typisch oder atypisch klassifiziert wurden, wurden mit dem *E. coli* Latex (Oxoid) Kit gemäß Herstellerangaben auf Latexagglutination untersucht:

Hierzu wurde je ein Tropfen steriles Aqua destillata (dest.) und ein Tropfen des zuvor aufgeschüttelten Testserums auf die mitgelieferte sterile Untersuchungskarte gegeben. Ein Teil der zu untersuchenden Kolonie wurde dann in den Tropfen Aqua dest. eingerieben und schließlich mit dem Testserum vermengt. Unter langsamen Schwenken der Untersuchungskarte zeigte sich im positiven Fall nach ca. 30-60 Sekunden eine Agglutinationsreaktion. In diesem Fall wurde noch eine Gegenprobe gemäß den Vorgaben des Herstellers zum Ausschluss einer Autoagglutination durchgeführt.

3.3.3 Duopath® Verotoxins, Fa. MERCK

Abb. 3.9: Duopath® *E. coli* O157, Fa. MERCK - Testsimplet



3.3.3.1 Testprinzip

Der Duopath® Verotoxins (s. Abb. 3.9) beruht wie auch der Singlepath® *E. coli* O157 auf dem Funktionsprinzip eines GLISA und dient dem Nachweis von Verotoxin 1 (VT1) und Verotoxin 2 (VT2). Er wurde ebenfalls im Juli 2004 vom AOAC Research Institute validiert (Zertifikat s. Anhang).

Die äußere Ansicht entspricht der des Singlepath® *E. coli* O157 mit dem Unterschied, dass sich im Ablesebereich neben der Kontrollzone C zwei Testzonen (VT1 und VT2) befinden. Wie die Bezeichnung schon vermuten lässt, handelt es sich hierbei um die Nachweiszonen für die beiden Shigatoxine (Syn. Verotoxine, VT) stx1 und stx2.

Die Durchführung des Duopath® Verotoxin (s. Abb. 3.10) wurde an die oben beschriebenen Untersuchungen angeschlossen, wobei nur die Proben untersucht

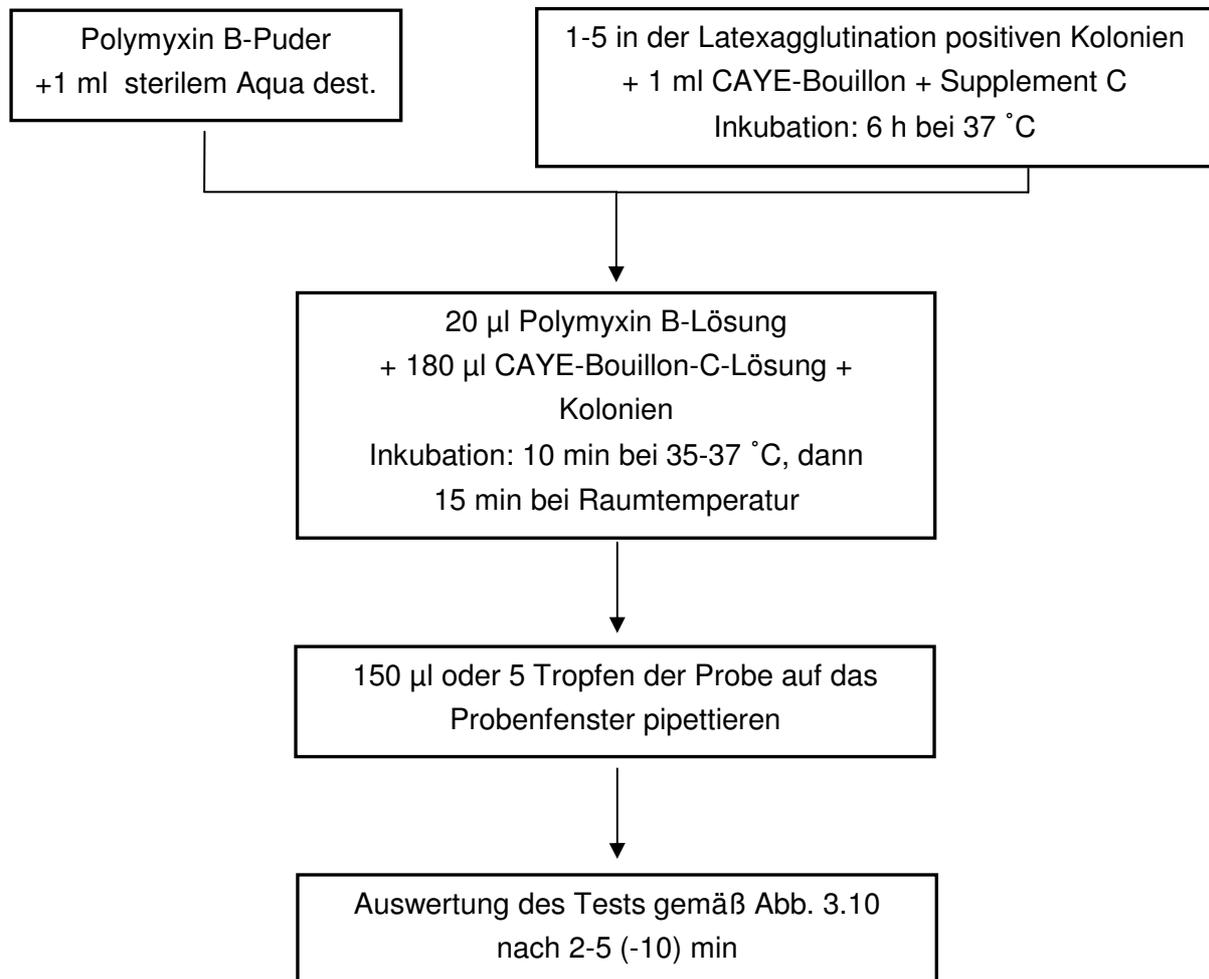
wurden, in denen mittels der abschließend durchgeführten Latexagglutination ein positiver Gehalt an *E.-coli*-O157-Antigen nachgewiesen wurde. Vor Bestückung des Testsimplets mit einer Probenlösung war eine spezielle Aufbereitung der Probenisolate notwendig. Grundlage hierfür war der kulturtechnische Erregernachweis. So wurden zunächst 1-5 der in der Latexagglutination positiven Kolonien vom CT-SMAC-Agar aufgenommen, in 1 ml CAYE-Bouillon + Supplement C gelöst und für sechs Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 180 µl dieser Lösung in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 20 µl einer Polymyxin-B-Lösung, bestehend aus Polymyxin-B-Puder, gelöst in 1 ml sterilem Aqua dest., vermengt (Zubereitung s. Kap. 8.1.2.3). Die so aufbereitete Probe wurde erneut 10 Minuten bei 35-37 °C inkubiert und vor der sich anschließenden Verwendung für die Untersuchung mit dem Duopath® Verotoxins weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Nach erneutem gründlichem Mischen der Probenlösung im Eppendorf-Röhrchen wurden nun die 15-20 Minuten zuvor dem Kühlschrank entnommenen und aus ihrer Schutzfolie entpackten Testsimplets durch Pipettieren von 150 µl oder fünf Tropfen aufs untere runde Probenfenster bestückt. Nach 5-10 (-20) min konnte das Ergebnis im oberen ovalen Ablesebereich ermittelt werden.

In der Reaktionszone des Duopath Verotoxins liegen zwei verschiedene mit kolloidalem Gold markierte Antikörper vor, nämlich ein Antikörper gegen stx1 und ein Antigen gegen stx 2. Dementsprechend bilden sich zwei verschiedene Antigen-Antikörper-Komplexe, die in zwei separaten Testzonen von dort linienförmig aufgebracht Anti-Antikörpern gebunden werden. Aufgrund der oben beschriebenen LPSR der Goldpartikel entsteht die rote waagrechte Farblinie, die das Vorhandensein von entweder stx1 oder stx2 oder beiden Shigatoxinen anzeigt.

Die goldmarkierten Antikörper, die nicht mit einem entsprechenden Antigen der Probe reagiert haben, fließen entlang der Nitrocellulose-Membran weiter zur Kontrollzone C und werden dort, ebenfalls linienförmig, gebunden. Die dadurch entstehende rote Farblinie zeigt wie schon beim Singlepath® *E. coli* das korrekte Funktionieren des Tests an und ist Voraussetzung für die Interpretation des Testergebnisses.

Abb. 3.10: Flussdiagramm zur Durchführung des Duopath® Verotoxins

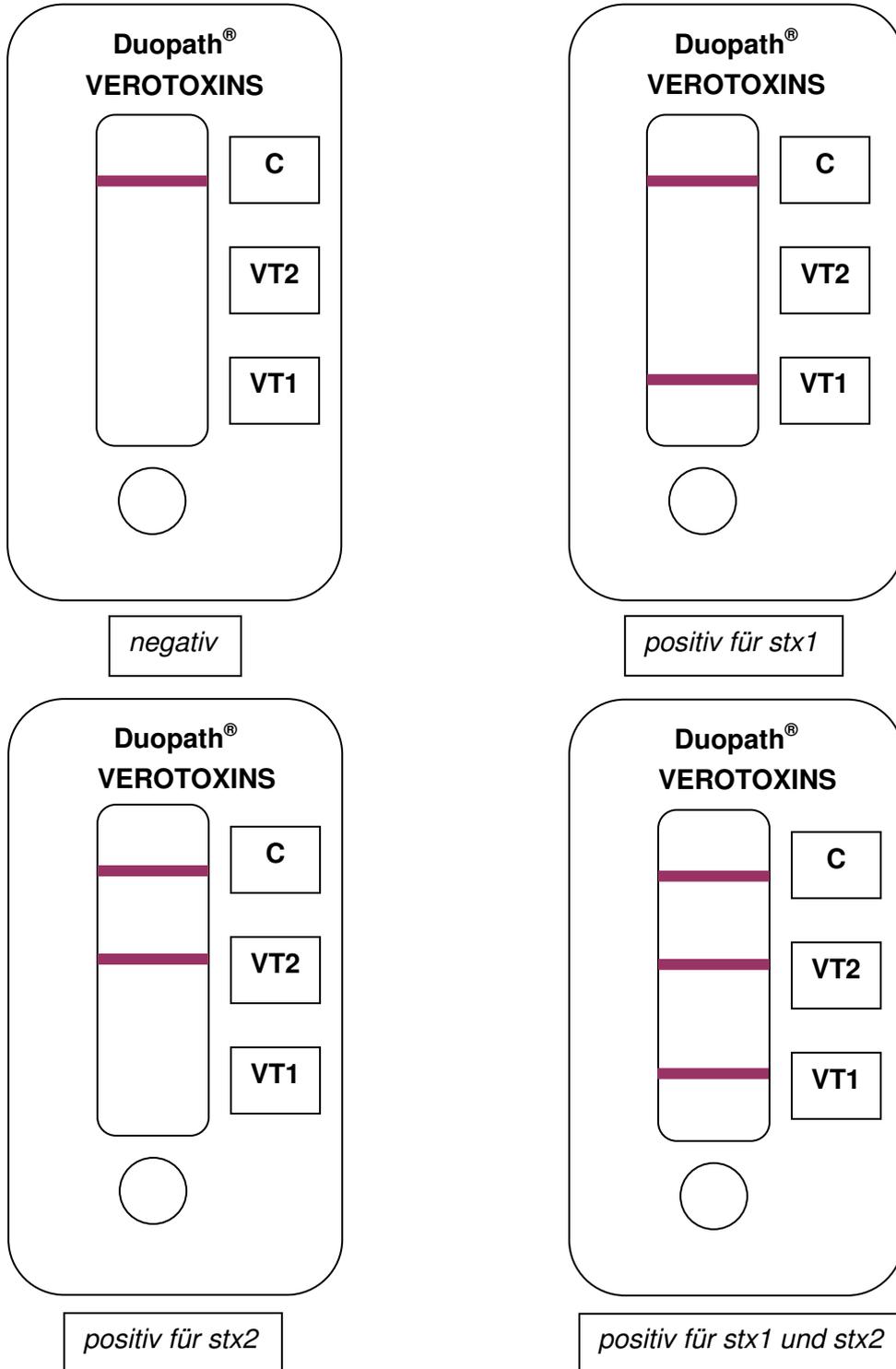


3.3.3.2 Auswertung des Testergebnisses

Die Auswertung des Duopath® Verotoxins folgt demselben Prinzip wie die Auswertung des Singlepath® *E. coli* O157. Auch bei diesem Test galt eine schwach rosafarbene Linie als positive Reaktion.

Eine rosa- oder pinkfarbene Linie in der Testzone VT1 zeigte das Vorhandensein von Shigatoxin 1 in der untersuchten Probe an, eine derartiges Farbsignal in der Testzone VT2 übermittelte den Gehalt an Shigatoxin 2 in der Probe. Selbstverständlich können in einer Probe beide Toxine vorliegen, was zur Ausbildung je einer Linie in der Testzone VT1 und VT2 führen würde (s. Abb. 3.11).

Abb. 3.11: Ergebnisauswertung des Duopath® Verotoxins



4 ERGEBNISSE

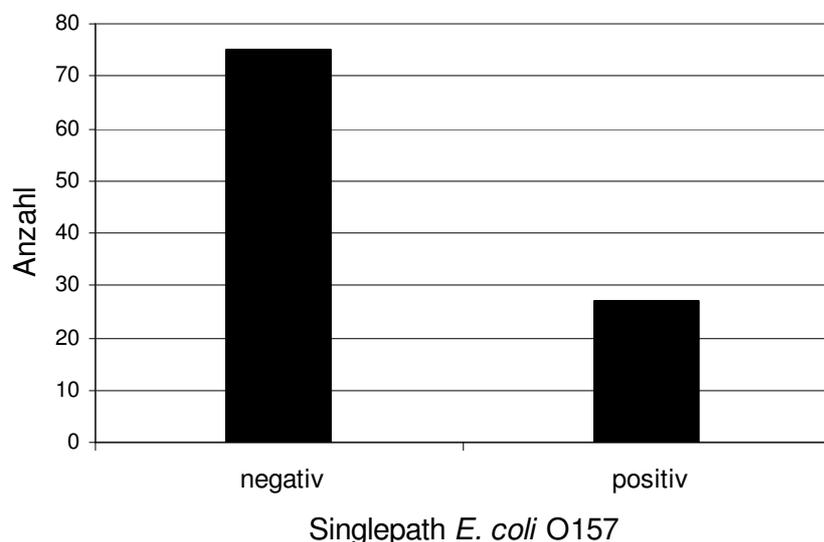
4.1 Auswertung der Ergebnisse

4.1.1 Gesamtprobenmenge

In den Jahren 2006 bis 2008 wurden insgesamt 102 Proben auf das Vorkommen von *E. coli* O157 und *Shigatoxinen* untersucht.

In der ersten Untersuchung mit dem Singlepath® *E. coli* O157 fiel das Ergebnis in 27 Fällen positiv aus (schwach positiv: 18, positiv: 9), in 75 Fällen negativ. Der Anteil positiver Proben bezogen auf die Gesamtprobenmenge ($n = 102$) lag somit bei **26,5 %** (s. Abb. 4.1).

Abb. 4.1: Ergebnis der Untersuchung mit dem Singlepath® *E. coli* O157 bezogen auf die Gesamtprobenmenge ($n = 102$)



Die Verteilung auf die verschiedenen Rindfleischprodukte/-teilstücke veranschaulichen Tabelle 4.1 und Abbildung 4.2. Hieraus geht hervor, dass der größte Anteil von 19 positiven Proben auf das Rinderhackfleisch entfällt, gefolgt von fünf positiven Rinderleberproben, zwei positiven Kalbfleischproben und einer

positiven Probe in gemischtem Hackfleisch aus der Gruppe der sonstigen Proben. In Ochsenmaulsalat konnte kein *E. coli* O157 nachgewiesen werden.

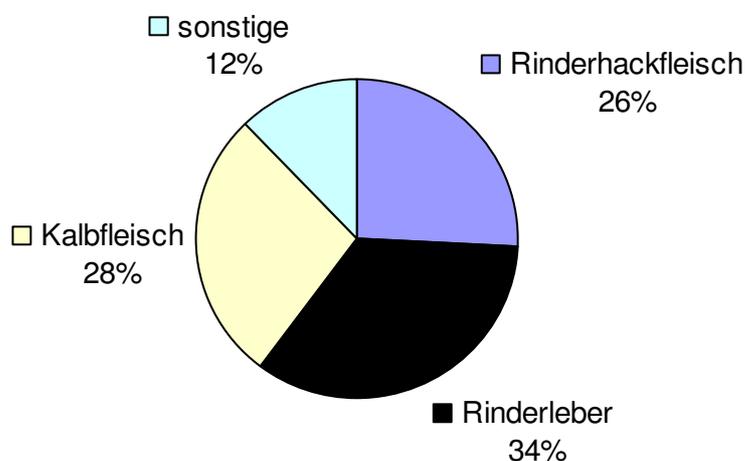
Betrachtet man den prozentualen Anteil positiver Proben innerhalb der einzelnen Gruppen lassen sich folgende Ergebnisse festhalten: die prozentual gesehen höchste Nachweisrate fand sich bei Rinderleber (31,3 %), gefolgt von Kalbfleisch (25 %) und Rinderhackfleisch (23,4 %). Eine positive Probe fand sich in der Gruppe „sonstige Produkte“ (11,1 %), wobei es sich hierbei um eine Probe aus gemischtem Hackfleisch handelte (s. Abb. 4.3).

Tab. 4.1: Prozentualer Anteil positiver Proben innerhalb der Gruppen der Rindfleischprodukte/-teilstücke

Produkt/Teilstück	n (gesamt)	davon positiv	Anteil in %
Rinderhackfleisch	62	19	23,4
Rinderleber	16	5	31,3
Kalbfleisch	8	2	25,0
sonstige	9	1	11,1

Bezieht man den prozentualen Anteil innerhalb der einzelnen Gruppen auf 100 %, lässt sich das Ergebnis wie folgt in einem Kreisdiagramm darstellen (s. Abb. 4.2):

Abb. 4.2: Vergleichende Darstellung des prozentualer Anzahl der positiven Proben innerhalb der Gruppe der Rindfleischprodukte/-teilstücke (bezogen auf 100 %)



Im nächsten Arbeitsschritt wurden alle 27 im Singlepath® *E. coli* O157 positiven Proben zum Zwecke der Anzucht auf CT-SMAC ausgestrichen und 24 Stunden bebrütet. In Falle der 75 bereits als negativ detektierten Proben wurde ein kulturtechnisches Verfahren nicht durchgeführt.

Wie in Tabelle 4.2 aufgezeigt, gelang in sechs Fällen keine Anzucht von Kolonien aus einer ausgestrichenen Probe („kein Wachstum), in neun Fällen bildeten sich Kolonien, die in ihrer Morphologie der Definition von „typischen Kolonien“ entsprachen. Die Kolonien von 12 der ausgestrichenen Proben wurden nach ihrem Wachstumsverhalten auf CT-SMAC gemäß der Definition als „atypisch“ eingestuft (s. Tab. 3.2).

Tab. 4.2: Ergebnis des Ausstrichs auf CT-SMAC

Anzahl	Wachstum auf CT-SMAC		
	typisch	atypisch	negativ
	9	12	6

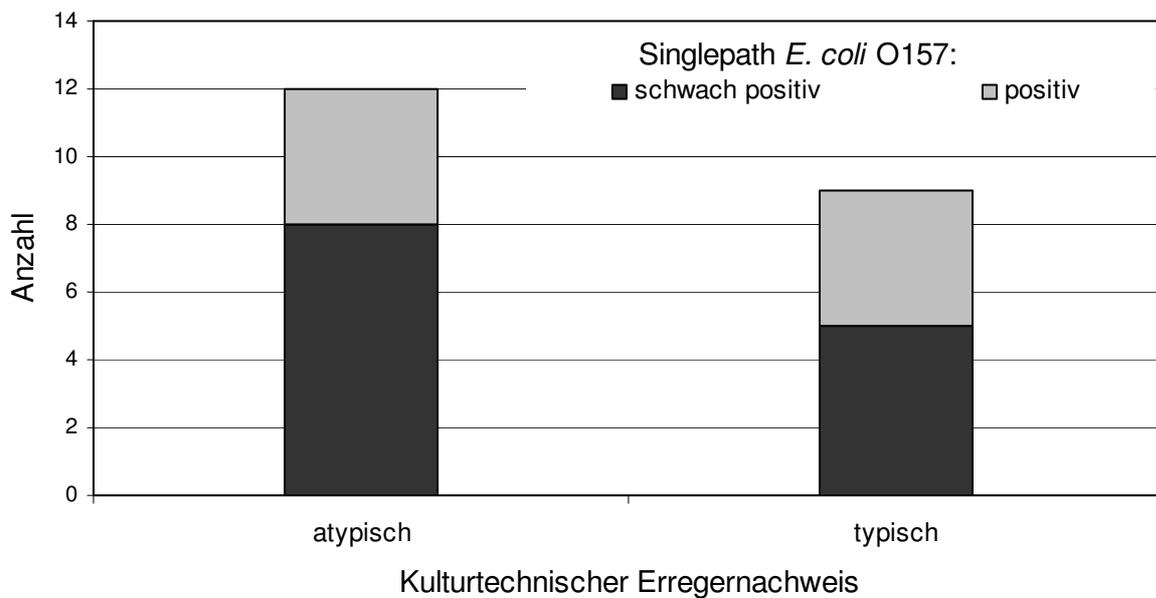
Tabelle 4.3 und Abbildung 4.3 zeigen die Verteilung der Ergebnisse des kulturtechnischen Verfahrens auf die Ergebnisse der Primärdetektion mit dem Singlepath® *E. coli* 157.

Es zeigte sich, dass von 13 Proben, die mit dem Singlepath® *E. coli* O157 als schwach positiv eingestuft wurden ein etwas größerer Anteil von 8 Proben (im Gegensatz zu 5 Proben mit typischem Wachstumsverhalten) eine atypische Koloniemorphologie ausbildeten. Kein Unterschied zeigte sich beim Wachstumsverhalten der im Singlepath® *E. coli* O157 positiven Proben (atypisch: 4; typisch 4). Mit Errechnung des Kontingenzkoeffizienten von 0,113 ($\chi^2(1) = 0,27$; $p = 0,604$) zeigte sich jedoch, dass *kein Zusammenhang* zwischen Ausprägung der Koloniemorphologie und dem Singlepath®-*E.-coli*-O157-Ergebnis bestand.

Tab. 4.3: Ergebnis des kulturtechnischen Verfahrens bezogen auf das Singlepath® - *E.-coli*-O157-Ergebnis - tabellarische Darstellung

		Ergebnis kulturtechnisches Verfahren	
		atypisch	typisch
Ergebnis Singlepath® <i>E. coli</i> O157	schwach positiv	8	5
	positiv	4	4

Abb. 4.3: Ergebnis des kulturtechnischen Verfahrens bezogen auf das Singlepath® - *E.-coli*-O157-Ergebnis - grafische Darstellung



Im Anschluss an den kulturellen Erregernachweis wurden die 21 auf CT-SMAC gewachsenen Bakterienkolonien mittels einer Latexagglutination auf Präsenz von *E. coli* O157 untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass ein positiver Zusammenhang zwischen der Koloniemorphologie beim kulturtechnischen Erregernachweis und positiver bzw. negativer Latexagglutination bestand (Kontingenzkoeffizient: 0,671 ($\chi^2(1) = 17,23$; $p < 0,001$)).

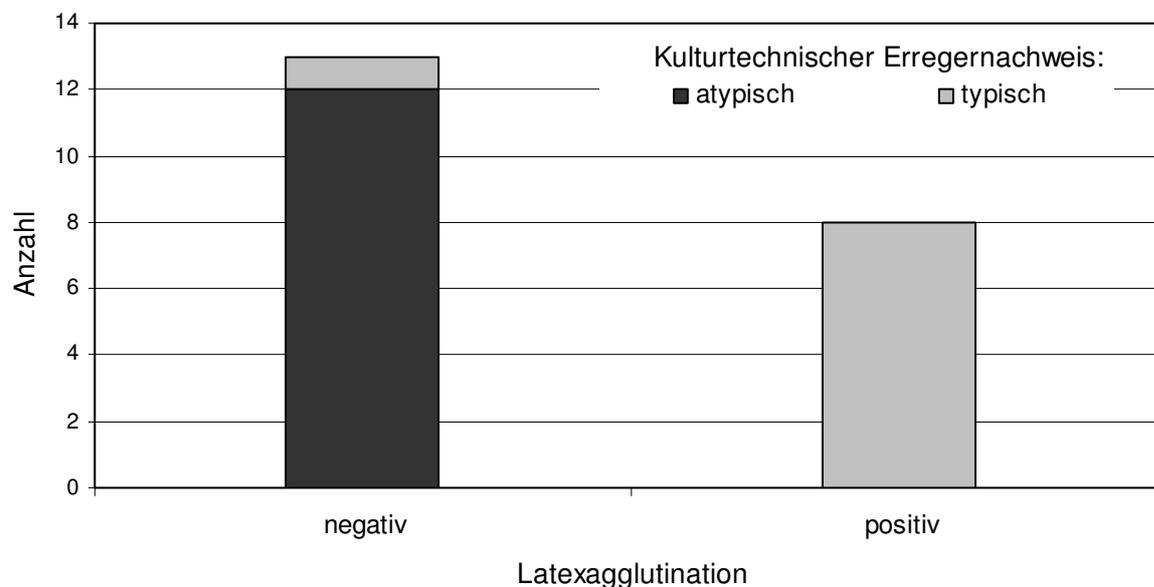
Wie aus Tabelle 4.4 und Abbildung 4.4 hervorgeht trat bei keiner der Proben, die ein atypisches Koloniewachstum auf CT-SMAC zeigten, eine positive Latexagglutination ein.

Im Gegensatz dazu konnte bei einer deutlichen Mehrheit der Proben mit typischer Koloniemorphologie *E. coli* O157 Antigen mit der Latexagglutination nachgewiesen werden (positiv: 8 Proben; negativ: 1 Probe).

Tab. 4.4: Ergebnis des kulturtechnischen Verfahrens bezogen auf das Latexagglutinations-Ergebnis - tabellarische Darstellung

		kultureller Erregernachweis	
		atypisch	typisch
Latexagglutination	negativ	12	1
	positiv	0	8

Abb. 4.4: Ergebnis des kulturtechnischen Verfahrens bezogen auf das Latexagglutinations-Ergebnis - grafische Darstellung



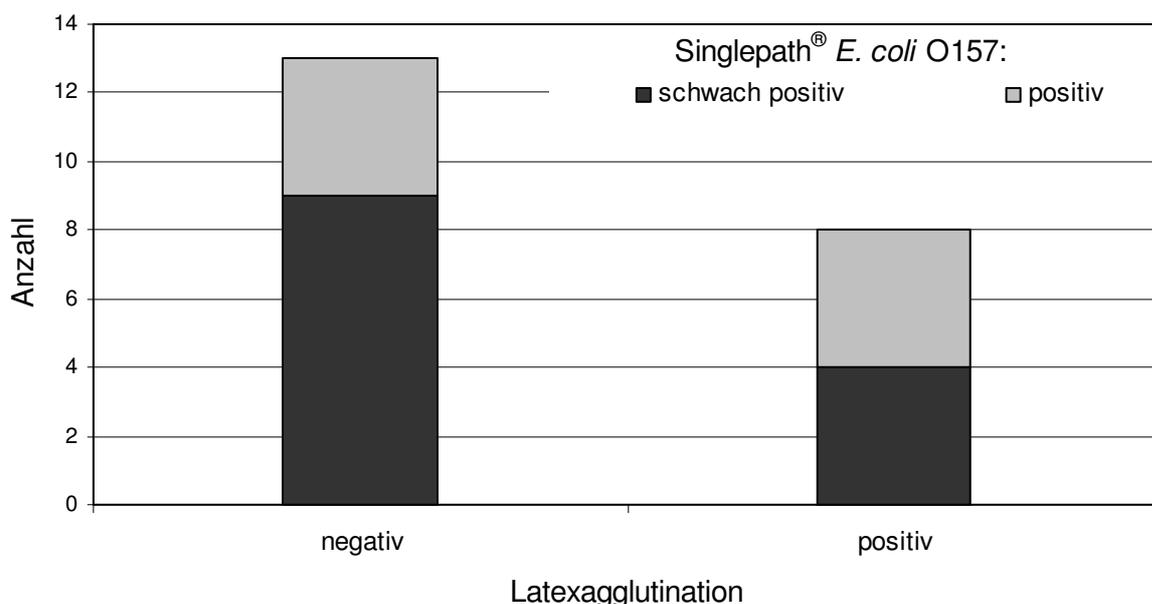
Eine direkte Beziehung zwischen positivem Singlepath[®]-*E. coli*-Befund und den Latexagglutinationsresultaten konnte nicht hergestellt werden.

Aus der folgenden Vierfeldertafel (Tab. 4.5) ergibt sich ein Kontingenzkoeffizient von 0,189 ($\chi^2(1) = 0,78$; $p = 0,378$): es bestand somit *kein direkter Zusammenhang* zwischen einer positiven oder negativen Latexagglutinations-Reaktion und den Ergebnissen des Singlepath[®] *E. coli* O157, auch wenn eine im Vergleich zwischen positivem und schwach positivem Singlepath[®]-*E. coli*-O157-Ergebnis (s. Abb. 4.5), in letztgenannten Fall eine höhere Anzahl der Proben eine negative Latexagglutination aufwiesen (schwach positiv: 9 negativ, 4 positiv; positiv: 4 negativ, 4 positiv).

Tab. 4.5: Ergebnis der Latexagglutination bezogen auf den Singlepath[®] *E. coli* O157
- tabellarische Darstellung

		Latexagglutination	
		negativ	positiv
Ergebnis Singlepath [®] <i>E. coli</i> O157	schwach positiv	9	4
	positiv	4	4

Abb. 4.5: Ergebnis der Latexagglutination bezogen auf den Singlepath[®] *E. coli* O157
- grafische Darstellung

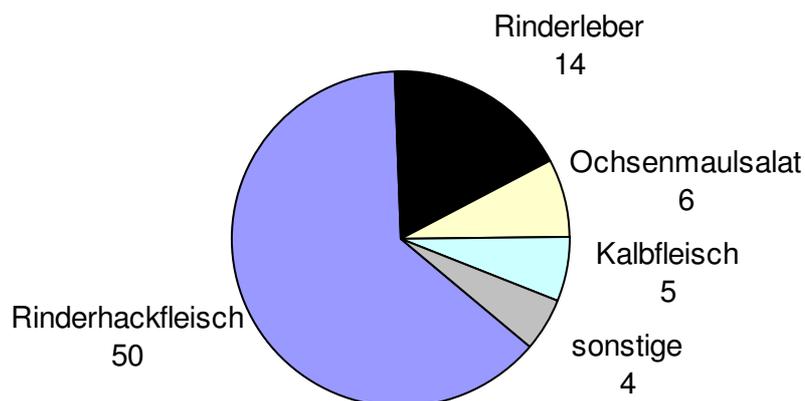


4.1.2 Proben aus Fleischerfachgeschäften und Supermärkten

Von den insgesamt 102 Proben wurden 79 unterschiedlicher Art in örtlichen Fleischerfachgeschäften entnommen, 23 Proben stammten aus Supermärkten.

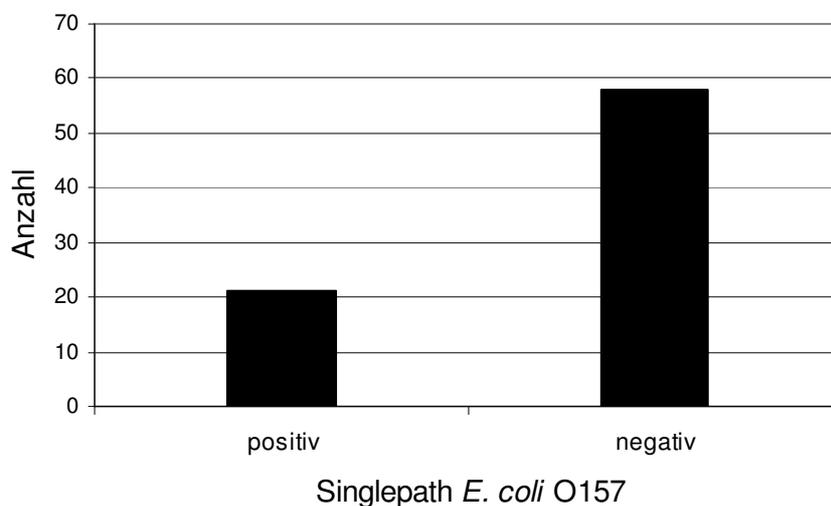
Bei den Proben aus den **Fleischerfachgeschäften** handelte es sich um verschiedene Rindfleischprodukte/-teilstücke, deren Verteilung in Abbildung 4.6 dargestellt ist (Rinderhackfleisch: 50, Rinderleber: 14, Ochsenmaulsalat: 6, Kalbfleisch: 5, sonstige: 4 (2 x Roastbeef, 1 x gemischtes Hackfleisch, 1 x Rinderhals)).

Abb. 4.6: Anzahl der Rindfleischprodukte/-teilstücke innerhalb der Proben aus Fleischerfachgeschäften



Die Gesamtzahl der im Singlepath® *E. coli* O157 als positiv befundeten Proben belief sich auf 21 Stück (schwach positiv: 16; positiv 5), was einen prozentualen Anteil der positiven Proben von **26,6 %** ausmacht und annähernd dem Anteil positiver Proben in der Gesamtprobenmenge (n = 102; 26,5 %) entspricht. Bei 58 der Fleischerfachgeschäft-Proben konnte mit dem Singlepath® *E. coli* kein *E.-coli*-O157-Antigen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.7).

Abb. 4.7: Ergebnis der Untersuchung der Fleischerfachgeschäft-Proben mit dem Singlepath® *E. coli* O157



Das Ergebnis des kulturtechnischen Erregernachweises auf CT-SMAC innerhalb dieser Probengruppe bezogen auf das Ergebnis im Singlepath® *E. coli* stellt sich wie in Tabelle 4.6 und Abbildung 4.8 aufgeführt dar. Neun der Probenisolate zeigten eine atypische Koloniemorphologie (davon im Singlepath® *E. coli* O157 schwach positiv: 7, positiv: 2), sieben Probenisolate bildeten die als typisch beschriebenen Kolonien aus (davon im Singlepath® *E. coli* O157 schwach positiv: 5, positiv: 2). In fünf Fällen gelang keine Anzüchtung auf CT-SMAC (davon im Singlepath® *E. coli* O157 schwach positiv: 4, positiv: 1).

Tab. 4.6: Vergleich des kulturtechnischen Erregernachweises auf CT-SMAC und des Singlepath[®]-*E.-coli*-O157-Ergebnis - tabellarische Darstellung

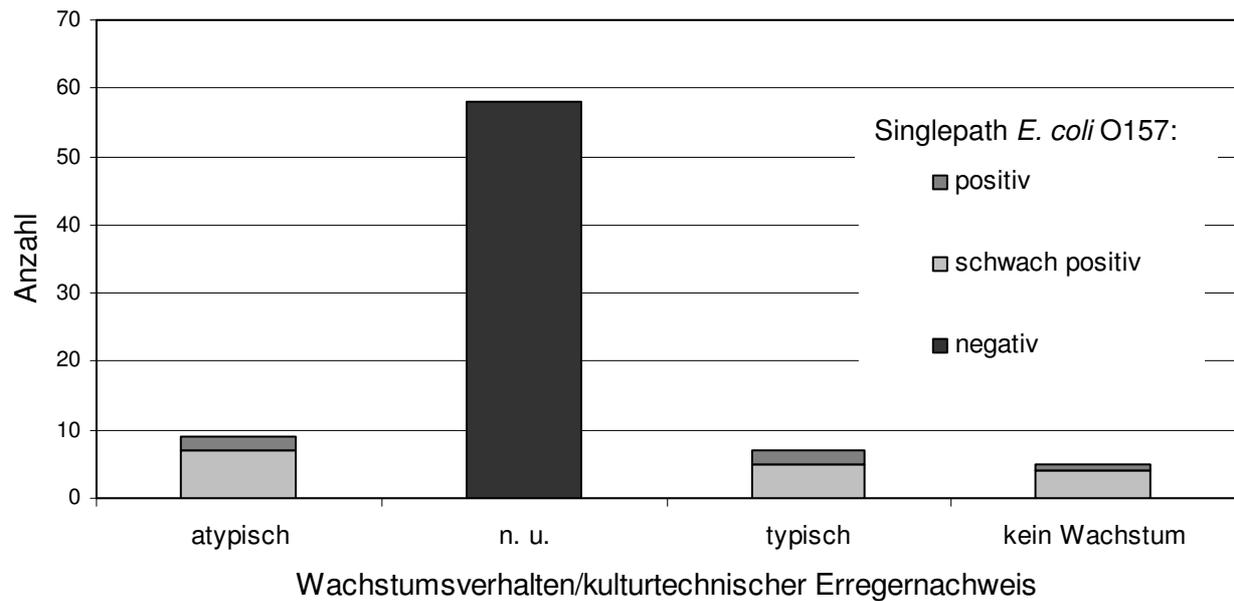
		Wachstumsverhalten / kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Ergebnis Singlepath[®] <i>E. coli</i>	negativ	0	58	0	0
	schwach positiv	7	0	5	4
	positiv	2	0	2	1

n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Abb. 4.8: Vergleich des kulturtechnischen Erregernachweises auf CT-SMAC und des Singlepath[®]-*E.-coli*-O157-Ergebnis - grafische Darstellung



n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Keines dieser atypisch gewachsenen Probenisolate konnte mit der im Anschluss durchgeführten Latexagglutination positiv auf Vorhandensein von *E.-coli*-O157-Antigen getestet werden, das Ergebnis innerhalb der Gruppe der typisch gewachsenen Isolate fiel konträr aus, ein positiver Nachweis gelang in der deutlichen Mehrzahl der Fälle (positiv: 6; negativ 1) (s. Tab. 4.7 und Abb. 4.9).

Tab. 4.7: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis - tabellarische Darstellung

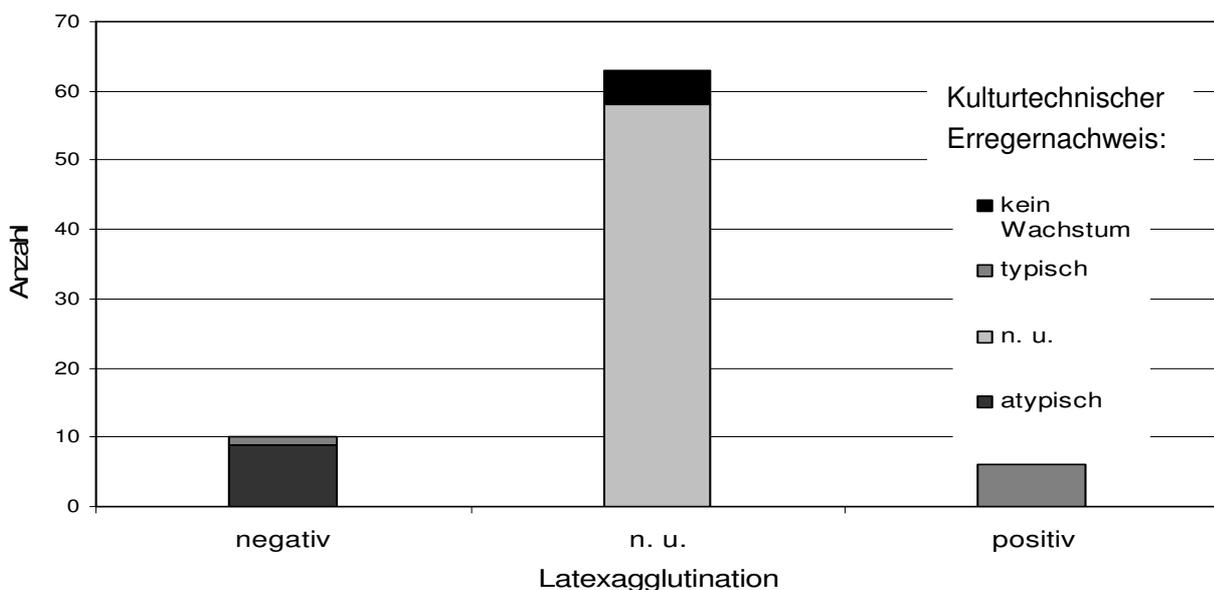
		Wachstumsverhalten / kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Latexagglutination	negativ	9	0	1	0
	n. u.	0	58	0	5
	positiv	0	0	6	0

n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Abb.: 4.9: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis - grafische Darstellung



n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Wie schon die Proben aus den Fleischerfachgeschäften waren auch die **Supermarktproben** zum größten Teil Proben von Rinderhackfleisch (12), daneben noch Proben von Kalbfleisch (3), Roastbeef (3), Rinderleber (2), sonstige (3, davon Beinscheibe vom Rind: 2, Ochsenmaulsalat: 1) (s. Abb. 4.10). Der Singlepath® *E. coli* O157 reagierte bei sechs untersuchten Proben positiv (4 positiv, 2 schwach positiv) in 17 Fällen negativ. Das entspricht einem prozentualen Anteil positiver Proben von **26,1 %** (s. Abb. 4.11).

Abb. 4.10: Anzahl der Rindfleischprodukte/-teilstücke innerhalb der Proben aus Supermärkten

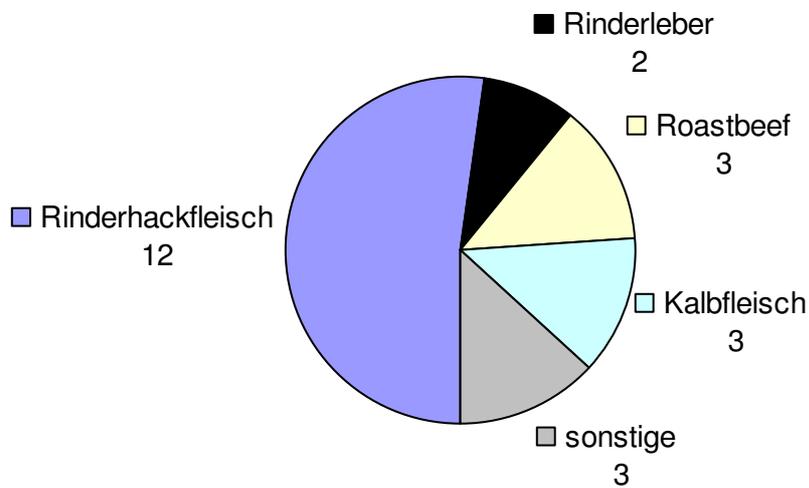
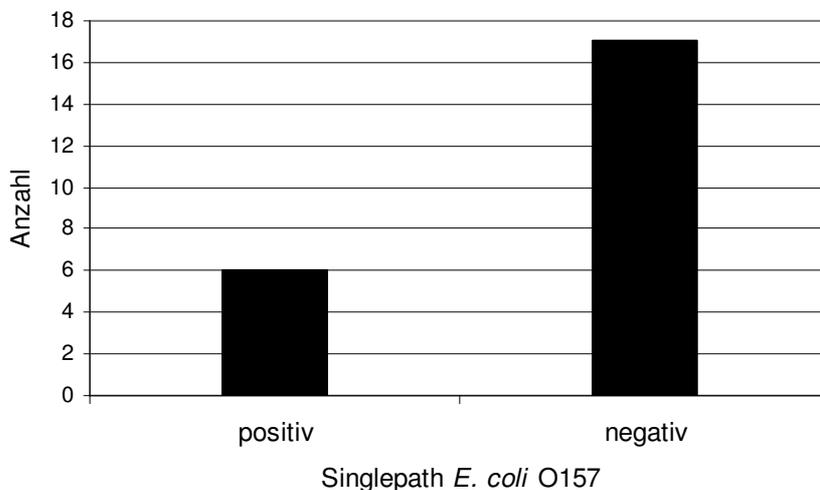


Abb. 4.11: Ergebnis der Untersuchung der Supermarkt-Proben mit dem Singlepath® *E. coli* O157

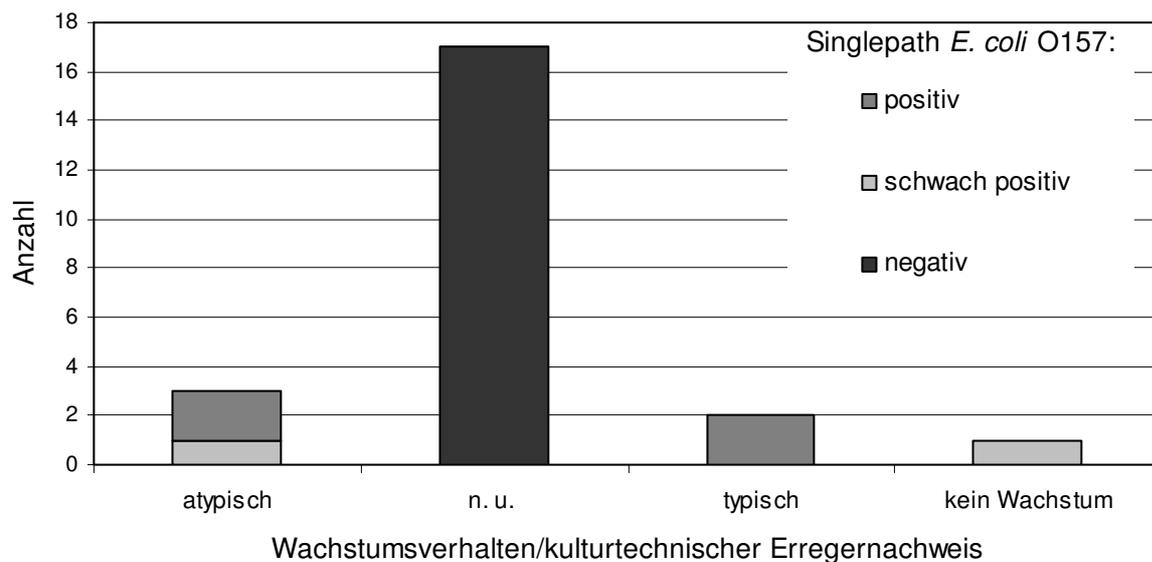


In puncto Wachstumsverhalten auf CT-SMAC-Agar stellte sich die Verteilung wie folgt dar (s. Tab. 4.8 und Abb. 4.12): in 2 Fällen bildeten sich Kolonien mit per definitionem typischer Koloniemorphologie (im Singlepath® *E. coli* positiv getestete Probe), in 3 Fällen bildeten sich atypische Kolonien aus den Probenisolaten (davon im Singlepath® *E. coli* positiv: 1, schwach positiv: 2). In einem Fall gelang keine Erregeranzüchtung auf CT-SMAC (Probenisolat im Singlepath® *E. coli* schwach positiv).

Tab. 4.8: Vergleich des kulturtechnischen Erregernachweises auf CT-SMAC und des Singlepath®-*E. coli*-O157-Ergebnis - tabellarische Darstellung

		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Befund Singlepath® <i>E. coli</i>	negativ	0	17	0	0
	schwach positiv	1	0	0	1
	positiv	2	0	2	0

Abb. 4.12: Vergleich des kulturtechnischen Erregernachweises auf CT-SMAC und des Singlepath®-*E. coli*-O157-Ergebnis - grafische Darstellung



n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Bei der weiteren Untersuchung der Erregerisolate mit der Latexagglutination konnte *E.-coli*-O157-Antigen nur bei zwei Proben nachgewiesen werden, deren Wachstumsverhalten auf CT-SMAC zuvor als typisch beurteilt wurde. Alle drei Erregerisolate die ein atypisches koloniemorphologisches Bild aufwiesen, zeigten keine Latexagglutinationsreaktion (s. Tab. 4.9 und Abb. 4.13).

Tab. 4.9: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis - tabellarische Darstellung

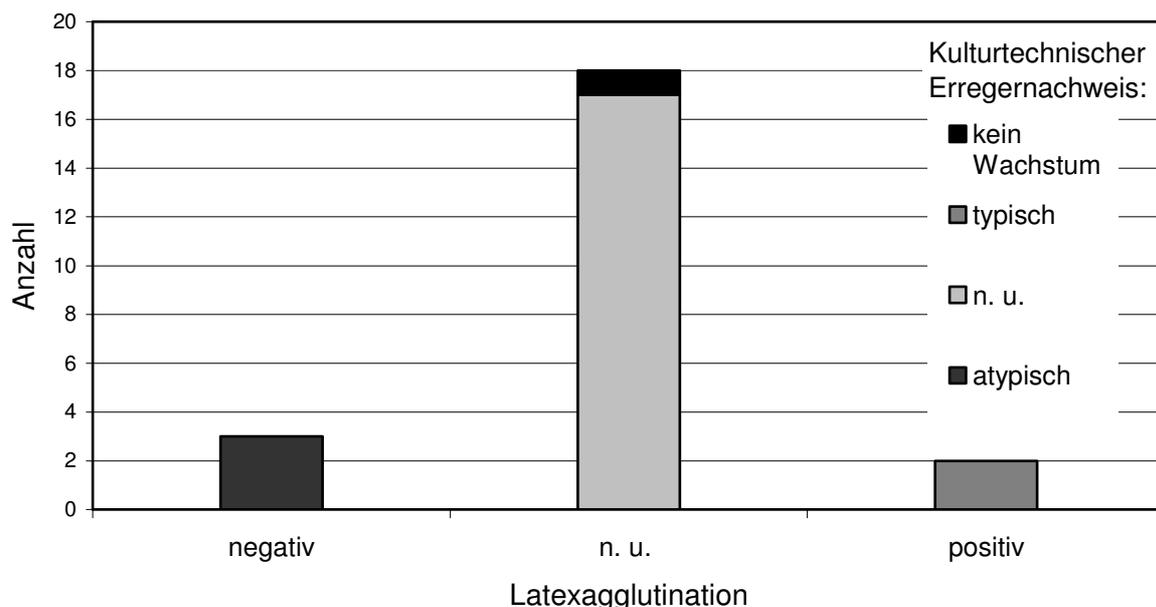
		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Latexagglutination	negativ	3	0	0	0
	n. u.	0	17	0	1
	positiv	0	0	2	0

n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Abb. 4.13: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis - grafische Darstellung



n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Vergleicht man nun die Ergebnisse aus **Fleischerfachgeschäften und Supermärkten** lässt sich statistisch belegen, dass es innerhalb dieser beiden Probengruppen keine Unterschiede bezüglich der Ergebnisse in den einzelnen Untersuchungsschritten gibt.

Tabelle 4.10 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem **Singlepath® E. coli O157** zusammen und es zeigt sich, dass der prozentuale Anteil positiver bzw. negativer Proben bei Fleischerfachgeschäften (positiv: 21, negativ: 58) und Supermärkten annähernd gleich ist (Fleischerfachgeschäft: **26,6 %**, Supermarkt: **26,1 %**), es gibt somit **keinen Unterschied** zwischen diesen beiden Probengruppen ($\chi^2(2) = 3,82$; $p = 0,148$).

Tab. 4.10: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Probenuntersuchung mit dem Singlepath® E. coli O157

		Ergebnis Singlepath® E. coli O157	
		negativ n (%)	positiv n (%)
Quelle	Fleischerfach- geschäft (n = 79)	58 (73,4)	21 (26,6)
	Supermarkt (n = 23)	17 (73,9)	6 (26,1)

n: Anzahl

Vergleicht man die Ergebnisse des **kulturtechnischen Erregernachweises**, so konnte mit $\chi^2(3) = 0,16$; $p = 0,984$ ebenfalls **kein Unterschied** zwischen den Probengruppen festgestellt werden. Im direkten Zahlenvergleich zeigen sich annähernd gleiche prozentuale Verteilungen (bezogen auf den gesamten Probenumfang einer Gruppe) bezüglich des Wachstumsverhaltens (s. Tab. 4.11).

Tab. 4.11: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des kulturtechnischen Erregernachweises bei Proben aus Supermärkten und Fleischerfachgeschäften

		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis		
		atypisch n (%)	typisch n (%)	kein Wachstum n (%)
Quelle	Fleischerfach- geschäft (n = 79)	9 (11,4)	7 (8,9)	5 (6,3)
	Supermarkt (n = 23)	3 (13,0)	2 (8,7)	1 (4,3)

n: Anzahl

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Auch der Vergleich der Ergebnisse der dritten Analyse, der **Latexagglutination**, führte zu dem Schluss, dass es **keinen Unterschied** zwischen der Probenkollekte aus Fleischerfachgeschäften und Supermärkten gab ($\chi^2(2) = 0,04$; $p = 0,983$).

Im Mittel lag der Anteil positiver Proben (bezogen auf die Gesamtzahl pro Gruppe) bei 8,15 % (Fleischerfachgeschäfte: 7,6 %, Supermärkte: 8,7 %) (s. Tab. 4.12).

Tab. 4.12: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Latexagglutination bei Proben aus Supermärkten und Fleischerfachgeschäften

		Latexagglutination	
		negativ n (%)	positiv n (%)
Quelle	Fleischerfachgeschäft (n = 79)	10 (12,7)	6 (7,6)
	Supermarkt (n = 23)	3 (13,0)	2 (8,7)

n: Anzahl

4.1.3 Frische Proben und tiefgefrorene Proben

Von den 102 entnommenen Proben waren 67 Proben zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns frisch, 35 Stück lagen in tiefgefrorenem Zustand vor. Innerhalb dieser beiden Gruppen zeigten sich die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Wie aus Abbildung 4.14 ersichtlich zählten zur Gruppe der **frischen Proben** 44 Rinderhackfleisch-, 10 Rinderleber-, 5 Kalbfleisch-, 3 Ochsenmaulsalat- und 5 sonstige Proben (2 Rinderbeinscheiben, 1 gemischtes Hackfleisch, 1 Roastbeef, 1 Rinderhalsstück).

Hiervon waren bei der Untersuchung mit dem **Singlepath® E. coli O157** insgesamt 19 Proben positiv (7 positiv, 12 schwach positiv), was einem prozentualen Anteil von **28,4 %** entspricht (s. Abb. 4.15).

Abb. 4.14: Anzahl der Rindfleischprodukte/-teilstücke innerhalb der Gruppe der frischen Probe

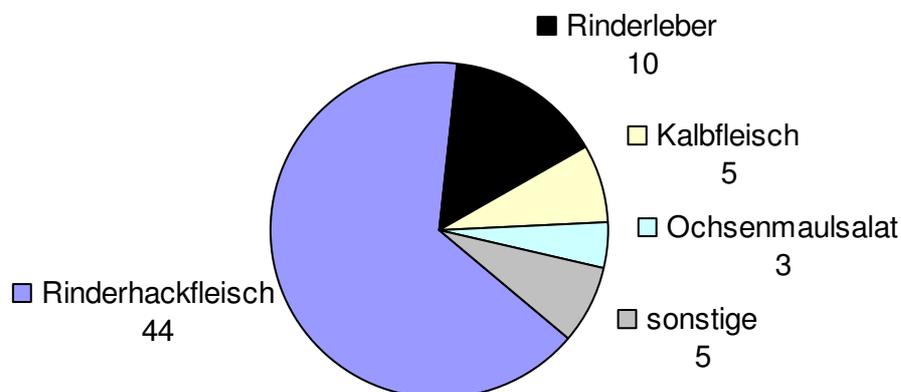
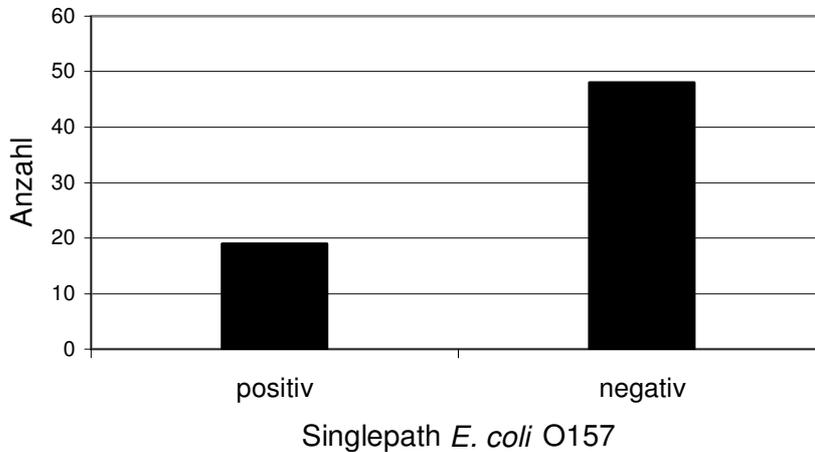


Abb. 4.15: Ergebnis der Untersuchung der frischen Proben mit dem Singlepath® *E. coli* O157



Beim **kulturtechnischen Erregernachweis** bildeten sich in sechs Fällen auf CT-SMAC typische Kolonien, in 11 Fällen wurden die Kolonien gemäß ihrer Morphologie als atypisch klassifiziert. In zwei Fällen gelang die Erregerisolierung nicht. Diese beiden Proben waren zuvor im Singlepath® *E. coli* als schwach positiv detektiert worden (s. Tab. 4.13 und Abb. 4.16).

Tab. 4.13: Vergleich des kulturtechnischen Erregernachweises und des Singlepath®-*E.-coli*-O157-Ergebnis in der Gruppe der frischen Proben - tabellarische Darstellung

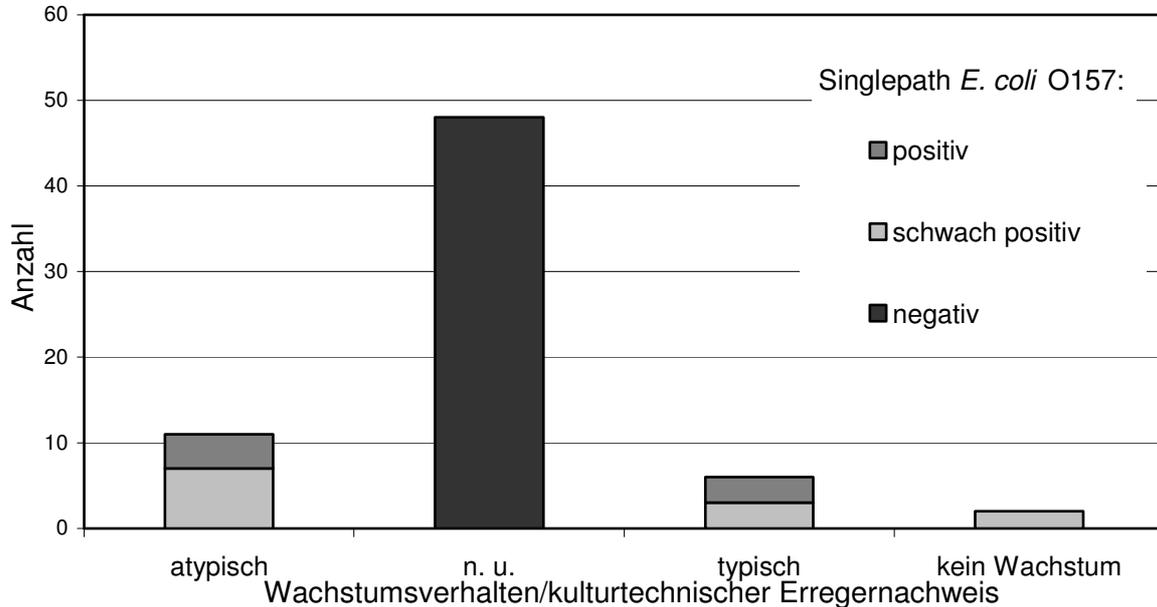
		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Ergebnis Singlepath® <i>E. coli</i>	negativ	0	48	0	0
	schwach positiv	7	0	3	2
	positiv	4	0	3	0

n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Abb. 4.16: Vergleich des kulturtechnischen Erregernachweises und des Singlepath®-*E.-coli*-O157-Ergebnis in der Gruppe der frischen Proben - grafische Darstellung



n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

In keiner dieser 11 atypischen Kolonien konnte mittels **Latexagglutination** ein Gehalt an *E.-coli*-O157-Antigen nachgewiesen werden, wohingegen fünf der sechs Isolate mit typischem Koloniewachstum eine positive Latexagglutination zeigten (s. Tab. 4.14 und Abb. 4.17).

Tab. 4.14: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis in der Gruppe der frischen Proben - tabellarische Darstellung

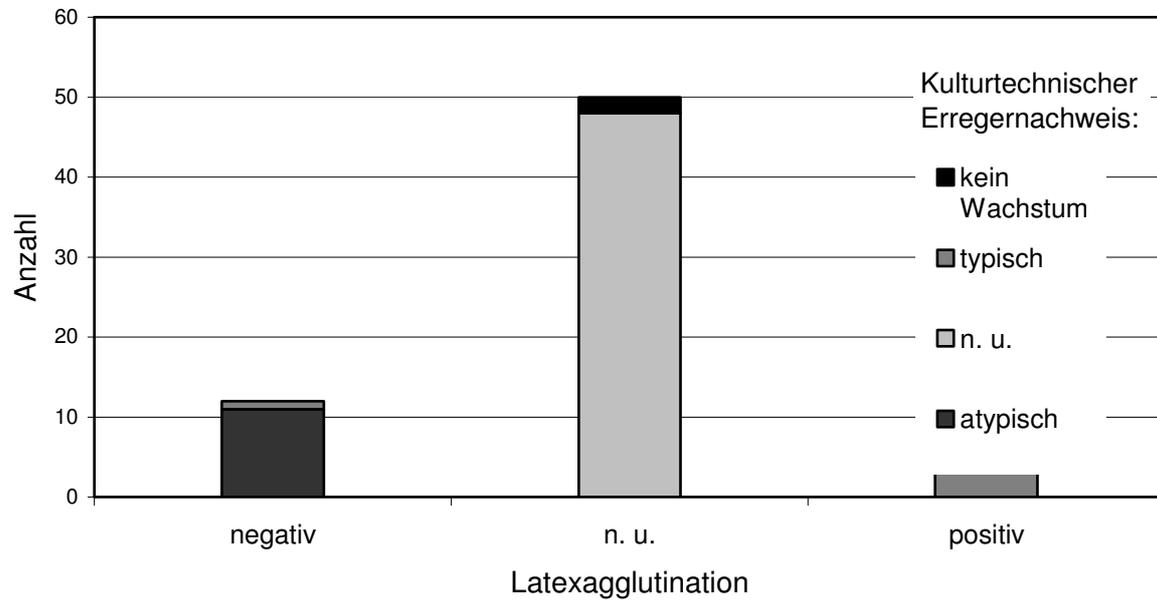
		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Latexagglutination	negativ	11	0	1	0
	n. u.	0	48	0	2
	positiv	0	0	5	0

n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Abb. 4.17: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis in der Gruppe der frischen Proben - grafische Darstellung



n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonie

Die **tiefgefrorenen Proben** verteilten sich wie in Abbildung 4.18 dargestellt auf die unterschiedlichen Rindfleischprodukte/-teilstücke (Rinderhackfleisch: 18, Rinderleber, 6, Ochsenmaulsalat: 4, Roastbeef 4, Kalbfleisch: 3).

Acht Proben dieser Gruppe waren bei Untersuchung mit dem **Singlepath® *E. coli* O157** positiv (2 positiv, 6 schwach positiv), in 27 Fällen fiel das Testergebnis negativ aus. Der prozentuale Anteil positiver tiefgefrorener Proben in diesem Untersuchungsschritt belief sich also auf **22,9 %** (s. Abb. 4.19).

Abb. 4.18: Anzahl der Rindfleischprodukte/-teilstücke innerhalb Gruppe der tiefgefrorenen Proben

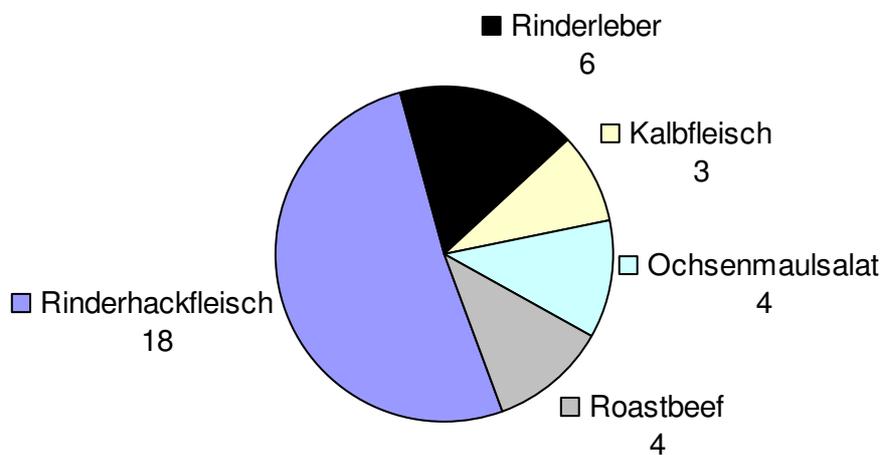
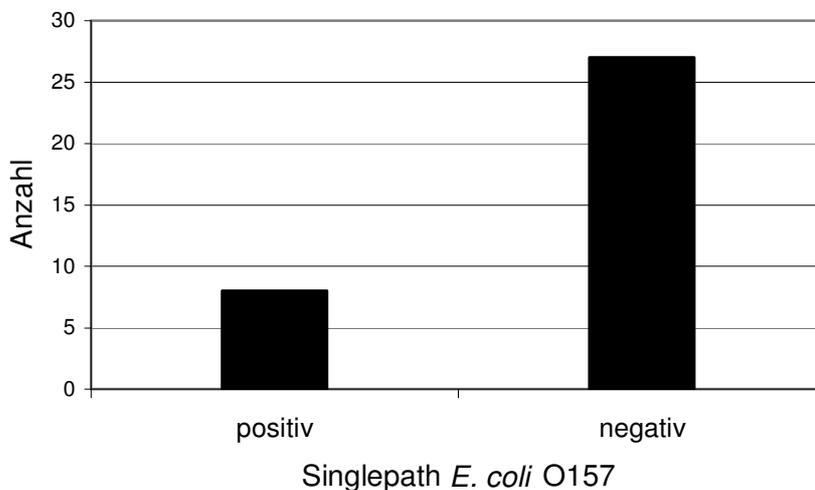


Abb. 4.19: Ergebnis der Untersuchung der tiefgefrorenen Proben mit dem Singlepath® *E. coli* O157



Im Schritt des **kulturtechnischen Erregernachweises** gelang in dieser Gruppe in vier Fällen die Erregeranzüchtung auf CT-SMAC nicht, wobei drei der vier Proben zuvor im Singlepath® *E. coli* eine schwach positives, eine Probe ein eindeutig positives Ergebnis zeigten. In lediglich einem Fall wurde die Kolonien gemäß ihres Wachstumsverhaltens als atypisch beurteilt (im Singlepath® *E. coli* O157 schwach positiv) in drei Fällen als typisch (im Singlepath® *E. coli* O157 schwach positiv: 2, positiv: 1). Siehe hierzu auch Tabelle 4.15 und Abbildung 4.20.

Tab. 4.15: Vergleich des kulturtechnischen Erregernachweises auf CT-SMAC und des Singlepath®-*E.-coli*-O157-Ergebnis in der Gruppe der tiefgefrorenen Proben - tabellarische Darstellung

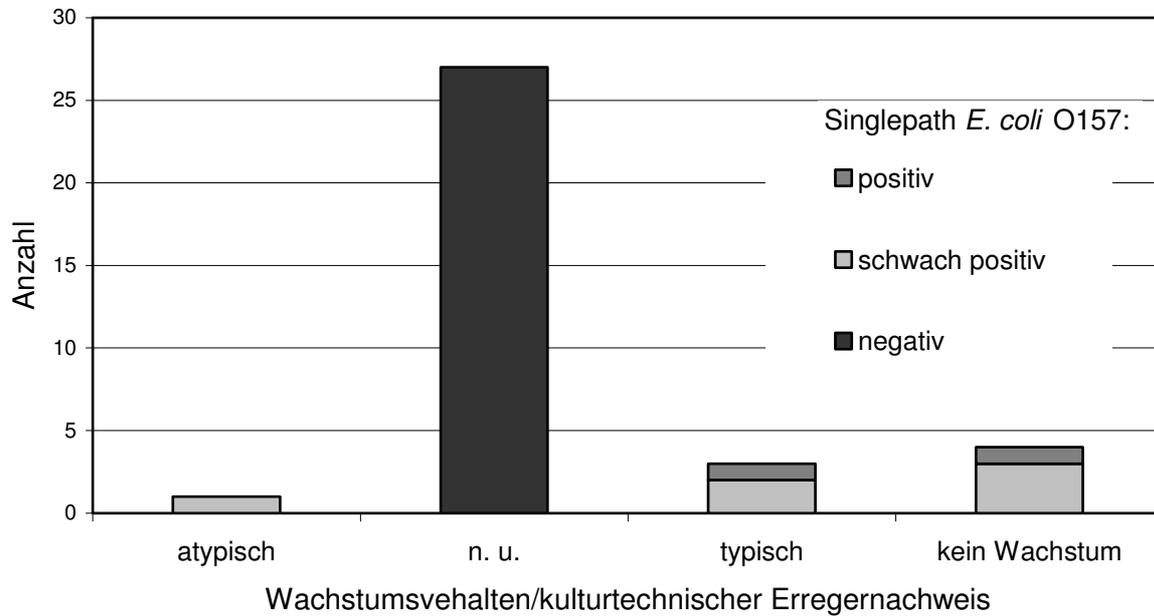
		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Ergebnis Singlepath®	negativ	0	27	0	0
	schwach positiv	1	0	2	3
	positiv	0	0	1	1

n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Abb. 4.20: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis in der Gruppe der tiefgefrorenen Proben - grafische Darstellung



Für alle drei Erregerisolate mit typischer Koloniemorphologie konnte mittels der **Latexagglutination** ein positiver Nachweis auf *E.-coli*-O157-Antigen geführt werden. Dieser fiel bei der atypisch gewachsenen Kultur negativ aus (s. Tab. 4.16 und Abb. 4.21).

Tab. 4.16: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis in der Gruppe der tiefgefrorenen Proben - tabellarische Darstellung

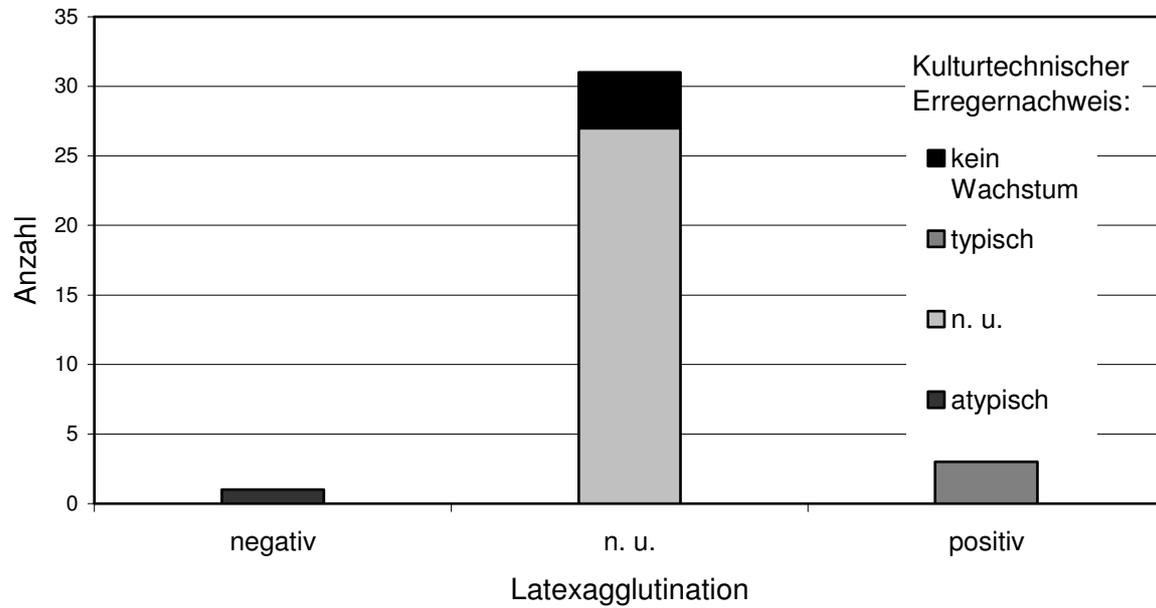
		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis			
		atypisch	n. u.	typisch	kein Wachstum
Latexagglutination	negativ	1	0	0	0
	n. u.	0	27	0	4
	positiv	0	0	3	0

n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Abb. 4.21: Ergebnis der Latexagglutination im Vergleich zum kulturtechnischen Erregernachweis in der Gruppe der tiefgefrorenen Proben - grafische Darstellung



n. u.: nicht untersucht

typisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, transparente, glänzende Kolonien

atypisch: kleine (ca. 1-2 mm), runde, rot/pink-farbene Kolonien

Vergleicht man die Ergebnisse der Untersuchungen der **frischen Proben mit denen der tiefgefrorenen Proben**, so weicht -wie in Tabelle 4.17 dargestellt- zwar der jeweilige prozentuale Anteil der im Singlepath® *E. coli* positiv getesteten Proben etwas deutlicher voneinander ab (frische Proben: **28,4 %**, tiefgefrorene Proben: **22,9 %**) als bei den Proben aus Fleischerfachgeschäften (26,6 %) und Supermärkten (26,1 %), jedoch liegt mit $\chi^2(2) = 0,69$; $p = 0,710$ mathematisch **kein Unterschied** vor.

Tab. 4.17: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung von frischen und tiefgefrorenen Proben mit dem Singlepath® *E. coli* O157

		Ergebnis Singlepath®	
		negativ n (%)	positiv n (%)
Quelle	frisch (n = 19)	48 (71,6)	19 (28,4)
	tiefgefroren (n = 35)	27 (77,1)	8 (22,9)

n: Anzahl

Etwas anders stellt sich der Vergleich des Ergebnisses beim **kulturtechnischen Erregernachweises** dar. Statistisch gesehen besteht hier ein **tendenzieller Unterschied** zwischen dem Wachstumsverhalten von frischen und tiefgefrorenen Proben ($\chi^2(3) = 6,48$; $p = 0,091$). So zeigten die frischen Probenisolate häufiger ein atypisches Probenwachstum als die tiefgefrorenen Isolate (frisch: 11 (57,9 %), tiefgefroren: 1 (12,5 %)), wohingegen die tiefgefrorenen Proben häufiger auf CT-SMAC-Agar kein Wachstum zeigten (frisch: 2 (10,5 %), tiefgefroren: 4 (50 %)). Im Falle eines Wachstums, war dies jedoch bei den zuvor tiefgefrorenen Proben häufiger typisch als bei Frischfleischproben (frisch: 6 (31,6 %), tiefgefroren: 3 (37,5 %)). Eine tabellarische Darstellung dieses Ergebnis findet sich in Tabelle 4.18.

Tab. 4.18: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des kulturtechnischen Erregernachweises bei frischen und tiefgefrorenen Proben

		Wachstumsverhalten/kulturtechnischer Erregernachweis		
		atypisch n (%)	typisch n (%)	kein Wachstum n (%)
Quelle	frisch (n = 19)	11 (57,9)	6 (31,5)	2 (10,5)
	tiefgefroren (n = 8)	1 (12,5)	3 (37,5)	4 (50)

n: Anzahl

Auch die Ergebnisse der **Latexagglutination** unterschieden sich zwischen den beiden Probengruppen. Wie in Tabelle 4.19 ersichtlich konnte bei den 17 untersuchten frischen Probenisolaten weniger häufig ein Gehalt an *E.-coli*-O157-Antigen mit diesem Untersuchungsverfahren nachgewiesen werden (positiv: 5, negativ:12). Von vier Probenisolaten der zweiten Gruppe (tiefgefrorene Proben), fiel in drei Fällen die Latexagglutination positiv und lediglich in einem Fall negativ aus. Mit $\chi^2(2) = 4,69$; $p = 0,096$ lässt sich statistisch ein **tendenzieller Unterschied** zwischen frischen und tiefgefrorenen Proben bezogen auf die Latexagglutination darstellen.

Tab. 4.19: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Latexagglutination bei frischen und tiefgefrorenen Proben

		Latexagglutination	
		negativ n (%)	positiv n (%)
Quelle	frisch (n = 17)	12 (70,6)	5 (29,4)
	tiefgefroren (n = 4)	1 (25)	3 (75)

n: Anzahl

4.1.4 Ergebnisse der Untersuchung mit dem Duopath® Verotoxins

Alle 21 mit im Singlepath® *E. coli* als positiv einzustufenden Isolate mit typischem/atypischem Wachstum auf CT-SMAC, wurden mit dem Duopath® Verotoxins auf ihre Fähigkeit zur Shigatoxinbildung untersucht.

In keinem Fall konnte ein positiver Nachweis für Shigatoxin 1 oder 2 geführt werden.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine qualitative Analyse von Rindfleischproben aus regionalen Fleischerfachgeschäften und Supermarktketten mit zwei validierten GLISA-Testsystemen der Fa. MERCK, Darmstadt durchgeführt. Die Kollekte wurden mit dem Singlepath® *E. coli* O157 auf *E. coli* O157 und die gewonnenen Isolate im Anschluss mit dem Duopath® Verotoxins auf Shigatoxin 1 und 2 überprüft.

Ziel war die Ermittlung der Prävalenz unter Berücksichtigung der Eignung der beiden Schnelltests zur Routinediagnostik in kleineren Laboratorien mit einfacher Grundausstattung.

5.1 Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Singlepath® *E. coli* O157

Die in dieser Studie ermittelte Nachweisrate des *E.-coli*-O157-Serovars von 26,5 % in Rindfleischproben ist auffallend hoch verglichen mit in der Literatur zu findenden Angaben bezüglich STEC-Prävalenzen.

Beim Vergleich dieser Zahlen muss berücksichtigt werden, dass in anderen Studien eine generelle STEC-Detektion durchgeführt wurde, kein ausschließlicher Nachweis des Serovars O157. Dies ist damit zu begründen, dass gerade in Deutschland der Serotyp O157 zwar nach wie vor ein großes Gefährdungspotenzial als Auslöser schwerwiegender Erkrankungen mit sich bringt, jedoch auch andere STEC-Serotypen mit ebenfalls pathogenem Potenzial nachgewiesen werden (Auflistung der am häufigsten nachgewiesenen, s. Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Inzidenz der häufigsten in Deutschland im Zusammenhang mit Erkrankungen nachgewiesenen EHEC-Serotypen (RKI, 2008c)

Serotyp	O26	O91	O103	O111	O157	Ont
Inzidenz 2007	0,07	0,03	0,06	0,01	0,06	0,02
Inzidenz 2008	0,06	0,03	0,03	0,01	0,05	0,02

Ont: nicht typisierter Serotyp

(RKI: Survstat, <http://www3.RKI.de/Survstat> Datenstand: 25.3.2009)

Eine Serotypisierung von 126 EHEC-Isolaten im Rahmen einer Nachweisstudie von EHEC in humanen Stuhlproben und Umgebungsproben in Bayern von SCHREIBER et al. (2006) lieferte ein ähnliches Ergebnis (s. Tabelle 5.1b):

Auch im Ausland rücken STEC-Serotypen wie O26, O103, O111 und O145 zunehmend in den Blickpunkt des Interesses (JENKINS et al., 2003; PEARCE et al. 2004).

Tab. 5.2: Auflistung der am häufigsten detektierten EHEC- Serotypen (nach SCHREIBER et al., 2006)

Serotyp	O26	O91	O103	O145	O146	O157
Anzahl	18	11	6	11	5	5

Des Weiteren muss bei Betrachtung der Ergebnisse der zahlreichen existierenden Studien über STEC-Prävalenzen ebenfalls beachtet werden, dass ein direkter Vergleich der jeweiligen Ergebnisse auch aufgrund der Unterschiede in Probennahme, Nachweismethodik und statistischer Auswertung schwierig ist (GYLES, 2007). So muss grundsätzlich unterschieden werden zwischen Daten, die sich auf die Untersuchung von Kotproben beziehen und solchen, die bei der Untersuchung von Lebensmittelproben erhoben wurden.

Die Nachweishäufigkeiten von STEC O157:H7 in **Rinderfäzes** reichten von 0% (CONEDERA et al., 1997; BONARDI et al., 1999) bis über 40 % (MECHIE et al., 1997, RICHTER et al., 1997). AL-SAIGH et al. veröffentlichten 2004 eine Studie, in der die fäkale Ausscheidung verschiedener Keime, u. a. auch von *E. coli* O157, bei schweizerischem Schlachtvieh untersucht wurde. Von 2.930 mittels PCR untersuchten Proben waren 1,6 % positiv auf *E. coli* O157. Bei deutschem Schlachtvieh wiesen RICHTER et al. (1997) VTEC in 47,6 % in Kot nach, VTEC O157 wurden nicht gefunden. GEUE et al. (2002) ermittelten in einer Langzeitstudie in vier deutschen Rinderbeständen sogar eine Prävalenz von STEC in Kot von 29-82 %. STEC O157 wurde in dieser Arbeit nur sporadisch gefunden.

MESSELHÄUSSER publizierte 2005 das Vorkommen von STEC bei Almkühen und in auf der Alm produzierten Lebensmitteln. Mittels PCR und Real-Time-PCR konnte ein Kontaminationsgrad der Rinderkotproben mit STEC in der Winterperiode (Stallhaltung) von 47,3 % ermittelt werden. In der Sommerperiode (Weidehaltung) lag

die Nachweisrate bei 29,8 %. Jedoch konnte bei der Serotypisierung von 41 % (n = 34) der STEC-Isolate kein O157 nachgewiesen werden (MESSELHÄUSSER, 2005).

Bezüglich der untersuchten **Lebensmittelproben** fanden sich in dieser Studie kein STEC in Milchproben, eine von 10 untersuchten Lebensmittelproben (Käse) war mittels Real-Time-PCR positiv auf STEC, jedoch gelang eine Kolonieblothybridisierung in diesem Fall nicht. Der Serotyp O157 wurde nicht gefunden (MESSELHÄUSSER, 2005). BRINKMANN wies 2007 STEC bei 5,2 % untersuchter Schlachtkörper und 4,8 % untersuchter kurzgereifter Rohwürste nach. Eine Serotypisierung wurde nicht durchgeführt. Eine ähnliche Zahl ermittelten DOYLE et SCHOENI in den USA im Jahre 1987 mittels eines Immunoblot-Verfahrens: sie nannten eine *E.-coli*-O157:H7-Prävalenz in Rindfleischproben von 3,7 %.

Im Anschluss an die Untersuchung der Proben mit dem Singlepath® *E. coli* O157 folgte der kulturtechnische Erregernachweis auf CT-SMAC. In der vorliegenden Arbeit konnten von 27 im Singlepath® *E. coli* O157 positiven Ergebnissen lediglich in 21 Fällen morphologisch typisch oder atypisch erscheinende Kolonien auf CT-SMAC angezüchtet werden. Dies entspricht bezogen auf die Gesamtprobemenge (n = 102) einem Anteil von 20,6 %.

Auf eine Untersuchung der im Schnelltest negativen Proben wurde unter Bezug auf die Herstellerangaben von falsch negativen Raten von weniger als ein Prozent verzichtet, da das primäre Ziel eine Verifikation der positiven Ergebnisse war.

Jedoch zeigten nur acht der als typisch/atypisch differenzierten Kolonien (7,8 %, bezogen auf n = 102) eine positive Latexagglutinationsreaktion mit *E. coli* O157-Antigen.

Für diese Abweichungen innerhalb der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsschritte lassen sich folgende Punkte aufführen:

Der kulturtechnische Erregernachweis von *E. coli* O157 auf Selektivmedien birgt gewisse Schwierigkeiten. Die Tatsache, dass der Singlepath® *E. coli* den Nachweis direkt aus der Anreicherungsbouillon erlaubt und somit eine vorherige Anzucht auf Medium nicht notwendig ist, könnte eine Erklärung für die um 5,9 Prozentpunkte höher liegende Prävalenz im Vergleich zum nächsten Schritt, dem kulturtechnischen Erregernachweis liefern.

Der Hersteller empfiehlt eine immunomagnetische Separation (IMS) bei der Anzuchtung auf dem Nährmedium zur Erhöhung der Konzentration und besseren Wiederfindung der *E.-coli*-O157-Stämme. Die IMS nutzen auch zwei Nachweisverfahren der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach

§ 64 LFGB, nämlich das „Horizontale Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Lebensmitteln“ (L 00.00.68) und das Verfahren zum „Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Fleisch und Fleischerzeugnissen“ (L 06.00.44). CHAPMAN et al. (1994) konnten zeigen, dass sich die Nachweisrate mit diesem Untersuchungsschritt um das 100-fache erhöhen lässt. Jedoch zeigte sich, dass die Sensitivität des Nachweises von *E. coli* O157:H7 in Rinderkot bei einem Keimgehalt von weniger als 100 KbE/g Probe gering war, auch bei Einsatz einer IMS. Es wurde vermutet, dass die Kontamination vieler Proben mit niedriger Keimkonzentration unentdeckt blieb (LEJEUNE et al., 2006). Auf die Durchführung einer IMS musste in dieser Studie aus Kostengründen verzichtet werden.

Jedoch können falsch positive Reaktionen im Singlepath® *E. coli* O157 nicht sicher ausgeschlossen werden. So sind Kreuzreaktionen mit *Citrobacter species* beschrieben: *Citrobacter (C.) braakii* wurde in einer Studie im Zusammenhang mit falsch positiven Ergebnissen im Singlepath® *E. coli* O157 in 16 Proben (6 %) nachgewiesen und als alleinige Ursache identifiziert. *C. braakii* wächst nicht auf CT-SMAC und exprimiert Sorbitol positive Kolonien auf SMAC (KHAN et al., 2003).

PARK et al. berichten ebenfalls von *Citrobacter spp. (C. sedlakii)*, die das *E.-coli*-O157-Antigen exprimieren und somit für falsch positive Testresultate verantwortlich sein können (PARK et al., 1998).

Der Hersteller des Testsystems gibt eine Rate falsch positiver Ergebnisse von weniger als ein Prozent an. Dieser Sachverhalt könnte auch eine Erklärung für die Diskrepanz des Ergebnisses des ersten Untersuchungsschrittes mit dem Schnelltest (26,5 % positiv befundene Proben) und des Ergebnisses der Latexagglutination (7,8 % positive Proben) sein. Zwar wäre aufgrund der O157-Antigen-präsentierenden Eigenschaften dieser Bakterien ebenfalls eine positive Latexagglutination zu erwarten, jedoch lassen sich *Citrobacter spp.* nicht auf CT-SMAC anzüchten.

Ergänzend sei an dieser Stelle erwähnt, dass die in jeder Testreihe mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen mit *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 und *E. coli* ATCC 15922 in allen Fällen korrekt identifiziert wurden. Auch bei einem im KHL im Juni 2007 durchgeführten Ringversuch (s. Anhang 8.2.3) konnte mit dem Singlepath® *E. coli* O157 das richtige Ergebnis ermittelt werden: die Probe war positiv auf *E. coli* O157, der Schnelltest und die Verifikationsschritte wiesen dies eindeutig nach.

Beim Vergleich der Ergebnisse innerhalb der verschiedenen Untersuchungsgruppen stellten sich darüber hinaus folgende Sachverhalte dar:

Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Prävalenz von *E. coli* O157 zwischen Supermarktproben und Proben aus Fleischerfachgeschäften ausgemacht werden.

Jedoch zeigten sich Unterschiede beim kulturtechnischen Erregernachweis und der Latexagglutination zwischen tiefgefrorenen und frischen Proben. So bildeten frische Proben häufiger Kolonien mit atypischer Morphologie auf CT-SMAC aus, während die Isolate aus den tiefgefrorenen Proben sich öfter auf dem Nährboden nicht anzüchten ließen. Gelingt die Anzüchtung der Isolate aus den tiefgefrorenen Proben jedoch, wurden die Kolonien häufiger als bei den frischen Proben als typisch klassifiziert.

Zudem konnte in dieser Arbeit ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen typischer Koloniemorphologie und positiver Latexagglutination hergestellt werden. Passend dazu zeigte sich auch, dass die Isolate aus tiefgefrorenen Proben - mit häufiger typischer Koloniemorphologie - eher eine positive Latexagglutinationsreaktion zeigten als die Isolate aus frischen Proben.

Ein möglicher Grund für diese Unterschiede beim kulturtechnischen Erregernachweis kann in der grundsätzlich höheren Gesamtkeimzahl sowie Speziesbreite in frischem Hackfleisch gesehen werden. Möglicherweise erschwert das Wachstum der Begleitflora die Wiederfindung von Kolonien mit typischer Morphologie. Ob jedoch tatsächlich das Tiefgefrieren einen positiven Effekt auf den kulturtechnischen Erregernachweis hat, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend beurteilt werden. Dies kann ein Ansatz für weitere Untersuchungen sein.

Aufgrund der in dieser Studie gewählten Methodik ist es nicht möglich eine definitive Aussage zu den folgenden Punkten zu treffen. Es bleibt offen, ob die Belastung von Rindfleischproben mit *E. coli* O157 aus dem Handel tatsächlich bei 26,5 % liegt und damit sehr hoch wäre, dies aber bisher unerkannt blieb, weil die jeweilig eingesetzten Methoden unter Umständen nicht sensitiv genug waren. Da die Vergleichszahlen aus anderen Studien sich aber in der Regel auf mittels PCR oder Real-time-PCR ermittelte Ergebnisse beziehen, ist dies unwahrscheinlich.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, könnte sich die Frage stellen, ob gegebenenfalls ein lokales *E.-coli*-O157-Problem im Landkreis Karlsruhe und Landkreis Rhein-Neckar-Kreis besteht. Gegen diese These sprechen jedoch die folgenden Zahlen: in den Jahren 2006-2008 wurden 19 EHEC-/STEC-Fälle aus den beiden genannten Landkreisen, die den Referenzdefinitionen entsprachen, an das RKI übermittelt. Zwar war in 13 Fällen der Serotyp unbekannt, eine Übermittlung eines Serotyps O157 erfolgte aber nicht (s. Tab. 5.3 und Tab. 5.4).

Tab. 5.3: EHEC-/STEC-Erkrankungsfälle in Baden-Württemberg, LK Karlsruhe/Rhein-Neckar-Kreis, 2006-2008

Jahr	Anzahl	Inzidenz
2006	10	1,04
2007	4	0,41
2008	5	0,52
Gesamt	19	0,66

(RKI: Survstat, <http://www3.RKI.de/Survstat> Datenstand: 25.3.2009)

Tab. 5.4: Im Zusammenhang mit Erkrankungsfällen übermittelte EHEC-/STEC-Serotypen in Baden-Württemberg, LK Karlsruhe/Rhein-Neckar-Kreis, 2006-2008

Serotyp	unbekannt	O26	O44	O91	O103	O146	O157
Anzahl	13	1	1	1	1	2	0

(RKI: Survstat, <http://www3.RKI.de/Survstat> Datenstand: 25.3.2009)

Im gesamten Erfassungszeitraum von 2001-2009 wurden dem RKI aus den genannten beiden Landkreisen lediglich im Jahr 2002 drei Fälle von EHEC/STEC O157 gemeldet, die alle im Landkreis Karlsruhe auftraten. Wie aus Tabelle 5.5 zu entnehmen, lag die sich daraus ergebende Inzidenz von 0,03 tiefer, als die für den gleichen Zeitraum ermittelten Inzidenzen für Gesamt-Baden-Württemberg (0,07) und für Deutschland (0,08).

Es bleibt aber zu berücksichtigen, dass die Falldefinitionen des RKI einen EHEC-Nachweis nur in Verbindung mit einem Nachweis von Shigatoxin 1 und/oder 2 bzw. einem Gennachweis von *stx1* und *stx2* gelten lassen. Daten bezüglich des Vorkommens von *E. coli* O157 werden nicht erfasst.

Tab. 5.5: EHEC-/STEC- O157-Erkrankungsfälle in LK Karlsruhe/ Rhein-Neckar-Kreis, Baden-Württemberg und BRD, 2001-2009

Region	Anzahl	Inzidenz
LK Karlsruhe/LK Rhein-Neckar-Kreis	3	0,03
Baden-Württemberg	71	0,07
BRD	697	0,08

(RKI: Survstat, <http://www3.RKI.de/Survstat> Datenstand: 25.3.2009)

HUS-Fälle traten 2006-2008 in den angegebenen Landkreisen zweimalig auf, beide Male im Landkreis Karlsruhe (s. Tab. 5.6).

Tab. 5.6: HUS-Fälle in Baden-Württemberg, LK Karlsruhe/Rhein-Neckar-Kreis, 2006-2008

Jahr	Anzahl	Inzidenz
2006	0	0,00
2007	2	0,21
2008	0	0,00
Gesamt	2	0,07

(RKI: Survstat, <http://www3.RKI.de/Survstat> Datenstand: 4.2.2009)

Berücksichtigt man diese Zahlen, erscheint ein hoher Anteil falsch positiver Ergebnisse am wahrscheinlichsten als Begründung für die hohe Nachweisrate.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die hohe Auffindungsrate des Serovars *E. coli* O157 mit der in dieser Studie herangezogenen Methodik hinsichtlich einer daraus abzuleitenden potenziellen Gefährdung für den Menschen unter Vorbehalt beurteilt werden sollte. Es handelt sich lediglich um einen Nachweis des Serotyps *E. coli* O157, der zwar hohes pathogenes Potenzial hat aber per se nicht krankmachend ist. Für die Beurteilung des vorliegenden Ergebnisses muss weiterhin berücksichtigt werden, dass bei der Anzüchtung auf CT-SMAC die Sorbitol-fermentierenden Isolate nicht nachgewiesen werden, diese aber als HUS-Erreger zunehmend an Bedeutung gewinnen (RKI, 2003; FRIEDRICH et al., 2007). Schlussendlich stellt sich die Frage, ob sich die mit dem Singlepath[®] *E. coli* ermittelte hohe Prävalenz durch einen großen

Anteil falsch positiver Ergebnisse durch andere *E.-coli*-O157-Antigen exprimierende Keime wie z. B. *Citrobacter spp.* erklären lässt. Um diese Punkte zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

5.2 Ergebnis der Untersuchung mit dem Duopath® Verotoxins

Alle im Singlepath® *E. coli* positiven Proben mit erfolgreichem kulturtechnischem Erregernachweis auf CT-SMAC wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Duopath® Verotoxins auf ihr Shigatoxin-Bildungsvermögen hin untersucht.

In keinem Fall zeigte der Test ein positives Ergebnis, es konnte also kein STEC O157 nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden gezielt nur die *E. coli* O157-positiven Proben auf ihren stx1- und stx2-Gehalt untersucht. Andere möglicherweise Shigatoxin-produzierenden STEC-Serotypen wurden dabei nicht erfasst.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Literaturangaben von MESSELHÄUSSER, 2005, die in ihrer Studie zwar verschiedene STEC-Serovare aus Lebensmittelproben nachweisen konnte, jedoch nie STEC O157 detektierte. Auch SCHREIBER (2008) zeigte, dass der Serotyp O157 eine abnehmende Tendenz unter den Shigatoxin-bildenden *E. coli* aufwies, was sich mit den Aussagen von BROOKS et al., 2005, JOHNSON et al., 2006 und BETTELHEIM, 2007 dahin gehend deckt, dass die Bedeutung der Nicht-O157-EHEC ansteigt. Unter Berücksichtigung des oben gesagten, ist dieses Ergebnis unter zwei Annahmen zu betrachten:

1. In keiner der untersuchten 21 mit dem Singlepath® *E. coli* O157 als positiv auf *E. coli* O157 einzustufenden Proben konnte eine Kontamination mit Shigatoxinen nachgewiesen werden, was bedeuten würde, dass trotz auffallend hoher *E.-coli* O157-Prävalenz keiner dieser Serovare ein Shigatoxinbildner war. Dies stützen Aussagen von FRIEDRICH et al. (2007b) und STEPHAN et al. (2007), die ebenfalls vom Nachweis Shigatoxin-negativer *E. coli* O157 berichten.
2. Mit der in dieser Studie gewählten Methodik wurden vorhandene STEC O157 nicht erfasst. Grund hierfür könnte dessen geringe Wiederfindungsrate beim kulturtechnischen Erregernachweis auf CT-SMAC sein, der Voraussetzung für die Durchführung des Duopath® Verotoxins war. Gegebenenfalls könnte die Anwendung einer IMS im Anreicherungsverfahren das Resultat verbessern.

5.3 Beurteilung der Eignung des Singlepath® *E. coli* O157 als Nachweisverfahren in der Lebensmitteldiagnostik

Bei der Untersuchung der Proben mit dem Singlepath® *E. coli* O157 bestätigten sich Aussagen anderer Studien, die das Testsystem als „ein leicht zu handhabendes und aufgrund der einfachen und sicheren Auswertungsmethode gerade für die Routineuntersuchung geeignetes Verfahren“ empfehlen (BÜLTE et al., 2003). Der Test wurde im Jahr 2004 vom AOAC Research Institute validiert (s. Anhang, Kap. 8.2.2, Abb. 8.3).

Die Fa. MERCK gibt für den Singlepath® *E. coli* O157 - Bezug nehmend auf die Versuche des AOAC Research Institute - eine Sensitivität von mehr als 99 % für die Untersuchung von rohem Hackfleisch und pasteurisierter Milch an. Die Spezifität und auch die Effizienz des Tests werden ebenfalls mit demselben Wert angegeben. Falsch negative und falsch positive Ergebnisse traten bei weniger als einem Prozent auf (Fa. MERCK). BÜLTE et al. (2003) nannten in ihrer Evaluierung vergleichbar hohe Werte für Sensitivität und Sensibilität: ihnen zufolge liegt die Sensitivität des Singlepath® *E. coli* O157 bei 96,4% und die Spezifität im Mittel zwischen Hackfleisch und Rohmilch bei 97,8 %.

Aufgrund des Verzichts auf ein parallel angewendetes etabliertes Untersuchungsverfahren (z. B. Real-time-PCR) kann mit dieser Studie keine Aussage über die Qualität des Singlepath® *E. coli* O157 getroffen werden. Eine weitere Evaluierung des Testsystems war nicht Ziel dieser Arbeit.

Diese diente vielmehr dazu, die Eignung dieses validierten Testsystems für ein kleines Labor ohne aufwendige gerätetechnische Ausstattung zu beurteilen. Nach Durchführung der Untersuchungsreihe lässt sich sagen, dass der Singlepath® *E. coli* O157 durchaus die Möglichkeit bietet, schnell und ohne großen zeitlichen und materiellen Aufwand zu einem Ergebnis zu kommen. Bei den für die Untersuchungsreihe benötigten Materialien und Reagenzien handelte es sich um Standards, die von verschiedenen Anbietern ohne Umstände bezogen werden können. Die Durchführung, sowohl des Schnelltests, als auch der angeschlossenen Untersuchungsschritte inklusive der Herstellung der Nährmedien (mEC-Bouillon und CT-SMAC-Medium) gestaltete sich einfach, war ohne aufwendige gerätetechnische Ausstattung durchzuführen und führte innerhalb kurzer Zeit (24 Stunden) zu einem Ergebnis.

Es stellt sich jedoch die grundsätzliche Frage nach dem Nutzen einer Untersuchung von Lebensmittelproben mit dem Singlepath® *E. coli* O157, da nur ein alleiniger Nachweis von *E. coli* O157 erfolgt, während andere Serotypen, die v. a. in

Deutschland eine mindestens genauso große Rolle spielen, unerkannt bleiben. Studien belegen, dass sehr viele unterschiedliche Serovaren der Gruppe STEC/EHEC angehören können, woraus sich ableiten lässt, dass *E. coli* nicht anhand des Serotyps einer Pathogruppe zugeordnet werden kann (BETTELHEIM, 2000 und 2003; BLUM et al., 1995; HEISSENHUBER et al., 2005; SCHREIBER, 2008). Die Diagnostik einer EHEC-Infektion sollte also nicht über den Serotyp, sondern ausschließlich über den Nachweis der Shigatoxine oder anderer Pathogenitätsfaktoren erfolgen (SCHREIBER et al., 2008).

Hinzu kommt, dass der alleinige Nachweis von *E. coli* O157 zunächst nicht rechtsbindend für die lebensmittelhygienische Beurteilung ist, da rechtliche Regelungen für *E. coli* O157 nicht bestehen und ohne Virulenznachweis auch bei einem Nachweis dieses Erregers nicht von einem gesundheitsgefährdenden Potenzial ausgegangen werden kann.

Bezüglich einer Einstufung eines Lebensmittels als „nicht sicher“ und somit „nicht verkehrsfähig“ im Sinne Art. 14, Abs. 1, VO (EG) 178/2002 sind folgende Aspekte zu berücksichtigen: Ist das Produkt als gesundheitsschädlich im Sinne Art. 14, Abs. 2a, VO 178/2002 in Verbindung mit Art. 14, Abs. 4a-c, VO (EG) 178/2002 zu beurteilen? Was gilt bezüglich der normalen Bedingungen der Verwendung durch den Verbraucher (Art. 14, Abs. 3a, VO (EG) 178/2002) und bezüglich der dem Verbraucher vermittelten Informationen (Art. 14, Abs. 3a, VO (EG) 178/2002)?

Dementsprechend kann ein alleiniger Nachweis von *E. coli* O157 ohne positiven Verotoxin-Nachweis zwar aufgrund der Kenntnisse über diesen Erreger ein Hinweis auf eine mögliche Gesundheitsgefährdung liefern, jedoch liegt damit noch kein Beweis für eine gesundheitsschädigende Wirkung vor.

Für eine rechtskräftige Beurteilung muss also im Falle einer positiven Singlepath[®]-*E. coli*-O157-Erstdetektion eine weitere Untersuchung, gemäß der Amtlichen Sammlung nach § 64, LFGB, durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich der Singlepath[®] *E. coli* O157 gemäß der Resultate der vorliegenden Studie als Screeningverfahren bei gezielter Fragestellung bzw. Suche nach *E. coli* O157 gut eignet, jedoch sein Ergebnis in keinem Fall als Grundlage für eine bindende lebensmittelhygienerechtliche Beurteilung dienen kann.

5.4 Beurteilung der Eignung des Duopath® Verotoxins als Nachweisverfahren in der Lebensmitteldiagnostik

Der Duopath® Verotoxins gestaltete sich in seiner Handhabung aufgrund einiger notwendiger Zwischenschritte zur Isolierung der Shigatoxine deutlich aufwendiger als der Singlepath® *E. coli* und entsprechend lag ein Ergebnis erst nach zweieinhalb bis drei Tagen vor. BÜLTE et al. (2003) sahen im Duopath® Verotoxins wie schon im Singlepath® *E. coli* O157 eine einfach zu handhabende Möglichkeit für die Routine-Diagnostik bei Lebensmitteln. Im Vergleich zur in dieser Studie angewandten Referenzmethode, dem Premier EHEC von Meridian Bioscience, Inc., wurde kein falsch-negatives und nur ein falsch-positives Ergebnis ermittelt. Eine Evaluierung durch das AOAC Research Institute erfolgte im Jahre 2004 (s. Anhang, Kap. 8.2.3, Abb. 8.5). Bezüglich der Sensitivität und Sensibilität bei der Untersuchung von Lebensmitteln nennt die Fa. MERCK Zahlen von über 99 % bezüglich des Nachweises von Shigatoxin1 und 2 in Lebensmitteln, falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse konnten bei Untersuchungen von tiefgefrorenen Stuhlproben nicht ermittelt werden (FA. MERCK). Wie bereits in Kapitel 5.2 erwähnt, konnten in dieser Studie mit dem Duopath® Verotoxins weder Shigatoxin 1 noch Shigatoxin 2 detektiert werden.

Grundsätzlich stellt sich die Frage nach der Sinnhaftigkeit des Einsatzes des Duopath® Verotoxins in der Lebensmitteldiagnostik im Vergleich zur Durchführung einer PCR. Er ist nicht als amtlich anerkannte Methode gemäß § 64 LFGB aufgeführt und liefert somit kein Ergebnis, was eine Beurteilung eines Erregers gemäß der Falldefinitionen des RKI ermöglicht. Für eine rechtsbindende Beurteilung ist zudem noch entscheidend, ob ein Rohverzehr durch entsprechende Kenntlichmachung sicher ausgeschlossen werden kann. Ist dies der Fall, wäre das Produkt auch im Falle eines Nachweises von VTEC verkehrsfähig (RENZ, 2007).

Nach derzeitigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass die verschiedenen Shigatoxin-Varianten sich in ihrer Pathogenität unterscheiden. Während stx1, stx2d und stx2e in der Regel bei Menschen mit nur milden Krankheitssymptomen nachgewiesen wird, rufen bestimmte stx-Subtypen (stx2/2c) häufiger ernsthafte Erkrankungen hervor (BOCKEMÜHL et al., 1998; HUBER et al., 1998; FRIEDRICH et al., 2002, MELLMANN et al., 2004; ORTH et al., 2007; PERSSON et al., 2007; SCHREIBER, 2008).

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse, stellt sich die Frage, ob eine ausschließliche Differenzierung in *stx1* und *stx2* wie beim Duopath® Verotoxins ausreichend ist. In der Arbeit von SCHREIBER (2008) konnten alle geprüften Subtypen (*stx2/2c, 2d, 2e*) beim Menschen nachgewiesen werden, was die Frage aufwarf, ob eine Subtypisierung in die Routinediagnostik aufgenommen werden sollte, da das Untersuchungsergebnis „*stx2*-positiv“ ohne die Kenntnis des jeweiligen Subtyps nicht umfassend bewertet werden kann (ORTH et al., 2007; SCHREIBER, 2008). Bedenkt man, welche Konsequenzen sich für infizierte Personen, v. a. für Langzeitausscheider, aus der geltenden Rechtsprechung ergeben, ist es überlegenswert, das Wissen über die variierende Pathogenität der verschiedenen Shigatoxin-Varianten entsprechend zu berücksichtigen (SCHREIBER, 2008).

Der Einsatz im klinischen Bereich zum Stellen einer primären Verdachtsdiagnose und Anpassung einer adäquaten Behandlung erscheint durchaus sinnvoll, eine Verwendung zur Verlaufskontrolle bei STEC-Ausscheidern muss unter Erwägung der genannten Gründe in Frage gestellt werden. Hinzu kommt, dass gerade im Zusammenhang mit der Entstehung von HUS noch ein weiterer Pathogenitätsfaktor, das Intimin, in den Blickpunkt des Interesses gerückt ist (BOCKEMÜHL et al., 1997; ETHELBERG et al., 2004). Dies findet bei dieser Art der Diagnostik keinerlei Berücksichtigung.

Bezieht man alle Fakten bezüglich rechtlichen Grundlagen, Notwendigkeit einer zuverlässigen Lebensmitteldiagnostik bei humanen Erkrankungsfällen, Zeitfaktor, Handhabung und auch die entstehenden Kosten bei Anwendung des Duopath® Verotoxins in die Beurteilung mit ein, lässt sich nach den Ergebnissen dieser Studie sagen, dass der Einsatz des Duopath® Verotoxins für die Lebensmitteldiagnostik gut überlegt sein will.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) stehen in Deutschland zusammen mit *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Yersinia* spp. an der Spitze der bakteriellen Lebensmittelinfektionserreger. *E. coli* O157 wird häufig im Zusammenhang mit schwerwiegenden Erkrankungen wie Hämorrhagische Colitis oder Hämolytisch-Urämischem Syndrom nachgewiesen, jedoch spielt dieser Serotyp beim Nachweis aus Lebensmitteln eine eher untergeordnete Rolle.

Ziel dieser Arbeit war neben der Ermittlung der Prävalenz von *E. coli* O157 und Shigatoxinen in Rindfleischproben im Landkreis Karlsruhe und Landkreis Rhein-Neckar-Kreis auch eine Beurteilung der Eignung der Schnelltestverfahren Singlepath® *E. coli* O157 und Duopath® Verotoxins zur Untersuchung von Lebensmittelproben im Sinne einer Primärdetektion.

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum von Februar 2006 bis November 2008 in einem nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditierten Labor, ohne DNA- und PCR-basierende Diagnostik, durchgeführt. Untersucht wurden 102 Rindfleischproben (größtenteils Hackfleisch) aus dem Einzelhandel der Region.

Vorgehensweise und Untersuchungsablauf mit dem Singlepath® *E. coli* O157 waren routinetauglich hinsichtlich Handhabung und Zeitaufwand und mit einer Standard-Laborausrüstung problemlos durchführbar. Die Analyse der Proben mit dem Duopath® Verotoxins gestaltete sich im Vergleich dazu aufwendiger.

Die Nachweisrate von *E. coli* O157 bei Einsatz des Singlepath® *E. coli* O157 lag mit 26,5 % deutlich über dem erwarteten Wert. Jedoch gelang nur in 21 Fällen der anschließende kulturtechnische Erregernachweis und bei lediglich 8 dieser Erregerisolate konnte mittels Latexagglutination *E.-coli*-O157-Antigen detektiert werden. Außerdem konnte ein deutlicher Zusammenhang bezüglich typischem Koloniewachstum auf CT-SMAC-Medium und positiver Latexagglutination beim Vergleich von Tiefkühl- sowie frischen Proben ermittelt werden. Shigatoxin-bildende Isolate wurden mit dem Duopath® Verotoxins in keinem Fall detektiert.

7 SUMMARY

Detection of *Escherichia coli* O157 and Shiga Toxins in beef samples collected in the region of Karlsruhe and the Rhine-Neckar-region, Germany using the MERCK Singlepath® *E. coli* O157 and Duopath® Verotoxins

In Germany Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are apart from *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* And *Yersinia spp.* The most frequent bacterial source of human gastroenteritis.

E. coli O157 is often related to fatal diseases like hemorrhagic *colitis* and haemolytic uremic syndrome. However this serotype plays a minor role within the detection in food.

The objective of this study was - besides the detection of the prevalence of *E. coli* O157 and of Shiga toxins in beef samples in the region Karlsruhe and the Rhine-Neckar-Region, Germany - to evaluate the applicability of the Singlepath® *E. coli* O157 and Duopath® Verotoxins as rapid tests for an initial detection.

The studies took place between February 2006 and November 2008 in a certified laboratory with standard equipment, but without any equipment for DNA- or PCR-based diagnostics. 102 beef samples collected at retail were examined.

The Singlepath® *E. coli* O157 was suitable for routine analytics concerning handling and expenditure of time. A complex laboratory equipment was not necessary either. The analysing of samples with the Duopath® Verotoxins by contrast took more time.

The prevalence of *E. coli* O157 detected with the Singlepath® *E. coli* O157 was with 26,5% higher than expected. However, only in 21 cases the pathogen could be cultured successfully, the agglutination test showed *E. coli* O157-antigen in merely 8 isolates. Furthermore the examination showed a correlation between typical growth on CT-SMAC and positive latex agglutination reaction when the deep frozen and the fresh samples were compared. In none of the samples a shiga toxin-producing microbial strain could be detected.

8 ANHANG

8.1 Anhang zu Material und Methoden

8.1.1 Allgemeine Arbeitsmaterialien

- Gefrierbeutel, 3000 ml, Fa. Gut und Günstig
- Folienstift OHP-M, permanent 224, refillable, Fa. Schneider
- Digitale Waage, portabel, Fa. Praetorius
- Bunsenbrenner mit Zündsicherung, Art.Nr. 7010, Fa. Götz
- Brutschrank, Typ B60, Fa. Memmert
- Stomacher Typ 0400, Fa. Meintrup Labortechnik
- Stomacherbeutel, steril mit Filterstreifen, Fa. Meintrup Labortechnik
- Autoklav, Fa. Fedegari, Italien
- Chirurgische Pinzette, Stainless III, Fa. Hauptner
- Pipetten: eppendorf Reference 100-1000 µl, Fa. Eppendorf
Zugehörige Pipettenspitzen 101-1000 µl , autoklaviert
- Eppendorf, safe-lock-tubes, 1,5 ml
- Erlenmeyerkolben, 250 ml, weithalsig
- Messzylinder hohe Form, 500 ml, Art. Nr. 380-230, Fa. Heiland
- Petrischale aus Polysterol, Durchmesser: 92 mm, Fa. Sarstedt AG & Co. KG
- Parafilm M[®] Verschlussfolie, 38 mm x 10 cm

8.1.2 Materialien für die Testdurchführung

8.1.2.1 Anreicherung der Probe

EC-Lösung

(Art-Nr. CM 853, Fa. Oxoid)

Zur selektiven Anreicherung von coliformen Bakterien und *E. coli* aus Lebensmitteln und Umweltmaterial. Die Lösung entspricht der ISO 11866-1 (ISO 11866-1, 1997).

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>(g/l)</i>
Trypton	20
Lactose	5,0
Gallensalze Nr. 3	1,5
Dikaliumphosphat	4,0
Kaliumphosphat	1,5
Natriumchlorid	5,0
pH-Wert	6,9 +/- 0,2

Zubereitung:

37 g des dehydrierten Mediums zur Herstellung der EC-Lösung in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und anschließend bei 121 °C für 15 min autoklavieren. Die Zubereitung erfolgte in der Nährbodenküche des Karlsruher Hygiene Labors (KHL).

Lagerung:

Trockennährböden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25 °C.

Novobiocin-Selektivsupplement

(Art.-Nr. SR 181, Fa. Oxoid)

Zur Isolierung von Salmonellen bzw. *E. coli* O157

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>mg</i>
(1 Röhrchen je 500 ml)	
Novobiocin	10

Novobiocin-Selektiv-Supplement aseptisch in 2 ml sterilem Aqua dest. lösen und unter sterilen Kautelen in die auf + 50 °C abgekühlte EC-Bouillon geben, gründlich mischen und ca. 20 ml in sterile Platten gießen.

Lagerung:

Bouillon:

Bei + 2 bis + 8 °C.

Verbrauch in der Regel innerhalb von 1-3 Tagen nach Herstellung.

Die Qualitätskontrolle wurde im Falle einer längeren Lagerung nach vier Wochen wiederholt.

*Qualitätskontrolle:*Überprüfung mittels Singlepath® *E. coli* O157 nach 18-24 h Inkubation bei 37 °C.

Im Anschluss Durchführung eines kulturellen Erregernachweises auf CT-SMAC mit Beurteilung der Koloniemorphologie und darauffolgender Latexagglutination.

Positivkontrolle: Probenansatz mit *E. coli* O157:H7 NCTC 12900Negativkontrolle: ein Sterilansatz ohne Beimpfung
ein Probenansatz mit *E. coli* ATCC 25922

8.1.2.2 Isolatanzüchtung im Zuge der Verifikationsreaktionen

Sorbit-MacConkey-Nährboden und Cefixim-Tellurit-Selektiv Supplement

Sorbit-MacConkey-Nährboden (SMAC)
(Art.-Nr. CM 813, Fa. Oxoid)

Zum Nachweis von *E. coli* Serogruppe O157:H7.

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>(g/l)</i>
Pepton	20
Sorbit	10
Natriumchlorid	5,0
Gallensalze	1,5
Neutralrot	0,03
Kristallviolett	0,001
Agar	15
pH-Wert	7,1 +/- 0,2

Zubereitung:

51,5 g des dehydrierten Mediums zur Herstellung von SMAC-Nährboden wurden in 1000 ml Aqua dest. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen erhitzt und dann 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Die Zubereitung erfolgte in der Nährbodenküche des KHL.

Lagerung:

Trockennährböden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25 °C.

Qualitätskontrolle:

Positivkontrolle: *E. coli* O157:H7 NCTC 12900

Negativkontrolle: *E. coli* ATCC 15922

Cefixim-Tellurit-Selektiv-Supplement und CT-SMAC-Selektivnährboden
(Art.-Nr. SR 172, Fa. Oxoid)

Zum Nachweis von *E. coli* O157:H7

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>mg</i>
(1 Röhrchen je 500ml)	
Kaliumtellurit	1,25
Cefixim	0,025

Zubereitung:

Der Inhalt eines Röhrchens Cefixim-Tellurit-Selektiv-Supplement wurde aseptisch in 2 ml sterilem Aqua dest. gelöst und dieses Supplement aseptisch 500 ml sterilem, auf 50 °C abgekühltem Basisnährboden zugegeben, das Ganze dann gut gemischt und die Platten gegossen.

Die Zubereitung erfolgte in der Nährbodenküche des KHL.

Qualitätskontrolle:

Positivkontrolle: *E. coli* O157:H7 NCTC 12900

Negativkontrolle: *E. coli* ATCC 15922

Lagerung:

Nährböden:

Bei + 2 bis + 8 °C

Verbrauch in der Regel innerhalb von 3-21 Tage nach Herstellung.

Nach 28 Tagen Lagerungsdauer erfolgte keine Verwendung mehr.

8.1.2.3 Probenvorbereitung für den Duopath® Verotoxins

CAYE-Bouillon und CAYE-Bouillon-Supplement

CAYE Bouillon modifiziert nach Evans

(Art.-Nr. 1.00060.0100, Fa. MERCK)

Für die Anzucht pathogener *E. coli* zur verstärkten Bildung der Verotoxin-Produktion während des Wachstums.

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>(g/l)</i>	
Casamino-säuren		20
Hefeextrakt		6,0
D (+) Glucose		2,5
Natriumchlorid		2,5
Di-Kalium-Hydrogen-Phosphat		8,71
Magnesiumsulfat		0,05
Manganchlorid		0,005
pH-Wert bei 25 °C		8,5 +/- 0,2

Zubereitung:

7,95 g des dehydrierten Mediums wurden in 1000 ml Aqua demin. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen in einem Wasserbad unter regelmäßigem Umrühren erhitzt und im Anschluss 15 min bei 121 °C autoklavieren.

CAYE-Bouillon-Supplement
(Art.-Nr. 1.00051.0001, Fa. MERCK)

Zusatz für die Zubereitung von CAYE Bouillon zum Nachweis von Verotoxinen pathogener *E. coli*.

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>µg</i>
pro Fläschchen	
Verotoxin Induktor	10

Zubereitung:

Der pulverige Inhalt wurde im Originalfläschchen durch Zugabe von 1 ml sterilem entsalztem oder destilliertem Wasser gelöst und in 200 ml CAYE Bouillon eingemischt, nachdem diese auf 45 °C abgekühlt wurde.

Unter sterilen Bedingungen erfolgte dann die Umfüllung der nun modifizierten CAYE-Bouillon in Röhrchen zu 1 ml.

Lagerung:

Trocken und gut verschlossen bei +2 °C bis +8 °C. Verwendbar vor dem ersten Öffnen bis zum Verfallsdatum nach Herstellerangaben.

Nach erstem Öffnen des Fläschchens war der gelöste Inhalt sofort zu verbrauchen.

Polymyxin – Lösung

Bacillus cereus-Selektiv-Supplement
(Art.-Nr. 1.09875.0001, Fa. MERCK)

Zur Isolierung von *Bacillus cereus*

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>IE</i>
pro Fläschchen	
Polymyxin B	50 000

Zubereitung gemäß den Vorgaben der Fa. MERCK, Herstellerangabe „Duopath®
Verotoxin“ (s. Kapitel 3.3.3.1)

8.1.2.4 AOAC-Evaluierungszertifikat des Singlepath® *E. coli* O157

LEADING THE WORLD IN PERFORMANCE-BASED VALIDATION

**Certificate of
Performance TestedSM
Status**

Certificate No. 010407

The AOAC Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit designated as:

Singlepath® *E. coli* O157

manufactured by

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Germany

has been reviewed under the AOAC Research Institute's *Performance Tested MethodsSM* Program, and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the Certification Report. This certificate authorizes the manufacturer to display the AOAC *Performance TestedSM* certification mark along with the statement - "THIS TEST KIT'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned test kit for a period of one year from the date of this certificate (January 1, 2008 – December 31, 2008). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

Signed for AOAC Research Institute:

A handwritten signature in black ink that reads 'Scott Coates'.

Scott G. Coates
Managing Director

CONTACT US

481 N. FREDERICK AVE, SUITE 500, GAITHERSBURG, MD 20877-2417 ☎ +1 (301) 924-7077 📠 +1 (301) 924-7089

🌐 [HTTP://WWW.AOAC.ORG/TESTKITS/TESTKITS.HTML](http://www.aoac.org/testkits/testkits.html)

8.1.2.5 AOAC-Evaluierungszertifikat des Duopath® Verotoxins



LEADING THE WORLD IN PERFORMANCE-BASED VALIDATION

**Certificate of
Performance TestedSM
Status**

Certificate No. 020402

The AOAC Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit designated as:

Duopath® Verotoxin

manufactured by

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Germany

has been reviewed under the AOAC Research Institute's *Performance Tested MethodsSM* Program, and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the Certification Report. This certificate authorizes the manufacturer to display the AOAC *Performance TestedSM* certification mark along with the statement - "THIS TEST KIT'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned test kit for a period of one year from the date of this certificate (January 1, 2008 – December 31, 2008). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

Signed for AOAC Research Institute:

A handwritten signature in black ink that reads 'Scott Coates'.

Scott G. Coates
Managing Director

CONTACT US

481 N. FREDERICK AVE, SUITE 500, GAITHERSBURG, MD 20877-2417 ☎ +1 (301) 924-7077 📠 +1 (301) 924-7089

🌐 [HTTP://WWW.AOAC.ORG/TESTKITS/TESTKITS.HTML](http://www.aoac.org/testkits/testkits.html)

8.2 Anhang zu Ergebnisse

8.2.1 Allgemeine Erläuterung zur statistischen Auswertung und Methodik

Bei Daten auf binärem oder nominalem Skalenniveau wird als Maß für den Zusammenhang häufig der Kontingenzkoeffizient verwendet. Um den Zusammenhang auf eine statistische Bedeutung hin zu untersuchen, wird üblicherweise der Chi-Quadrat-Test für Kontingenztafeln durchgeführt. Dabei wird - vereinfacht ausgedrückt - verglichen, ob das Verhältnis zwischen den Zeilen und Spalten einer Kontingenztafel an allen Stellen als gleich anzunehmen ist oder ob es gegebenenfalls einen speziellen Zusammenhang zwischen den einzelnen Ausprägungen der die Zeilen und Spalten überschreibenden Variablen gibt. Von einem solchen Zusammenhang zwischen den Merkmalen wird ausgegangen, wenn der Chi-Quadrat-Test in den charakteristischen Testwerten für den p-Wert ein Ergebnis kleiner als 0,05 produziert. Es kann ein wenigstens tendenzieller Zusammenhang angenommen werden, wenn das Ergebnis wenigstens 0,1 (für den p-Wert) beträgt.

In Kapitel 4.1.1 findet sich eine globale Betrachtung der Ergebnisse, also die vergleichende Darstellung der gesamten Datengrundmenge. In Kapitel 4.1.2 bis Kapitel 4.1.4 ist der lokale Überblick der Daten beschrieben, d. h. der Vergleich von jeweils zwei zusammenhängenden Datenmengen.

8.2.2 Ergebnisse der Untersuchung der Proben aus Metzgereien (n = 79)

Tab.: 8.3: Metzgereien - Frische Proben (n = 53)

Labornummer	Datum der Probenahme	Beginn der Probenuntersuchung	Probenmaterial	Ort der Probenahme	Singlepath® E. coli	Anzüchtung	Latexagglutination	Duopath® Verotoxins
2	10.10.2006	10.10.2006	Hackfleisch Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
3	10.10.2006	10.10.2006	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
4	10.10.2006	10.10.2006	Hackfleisch Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
5	10.10.2006	10.10.2006	Hackfleisch Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
6	31.10.2006	31.10.2006	Hackfleisch Rind	Büchenau	positiv	atypisch	negativ	n. d.
7	31.10.2006	31.10.2006	Kalbshals	Büchenau	positiv	typisch	positiv	negativ
8	06.11.2006	06.11.2006	Hackfleisch Rind	Büchenau	schwach positiv	atypisch	negativ	n. d.
9	06.11.2006	06.11.2006	Hackfleisch Rind	Weingarten	schwach positiv	atypisch	negativ	n. d.
10	06.11.2006	06.11.2006	Rinderhals	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
11	06.11.2006	06.11.2006	Hackfleisch gem.	Weingarten	schwach positiv	atypisch	negativ	n. d.
18	05.12.2006	05.12.2006	Hackfleisch Rind	Grötzingen	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
19	05.12.2006	05.12.2006	Hackfleisch Rind	Berghausen	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
20	05.12.2006	05.12.2006	Hackfleisch Rind	Berghausen	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
21	05.12.2006	05.12.2006	Hackfleisch Rind	Söllingen	negativ	n. d.	n. d.	n. d.

Fortsetzung Tab. 8.3

Labornummer	Datum der Probenahme	Beginn der Probenuntersuchung	Probenmaterial	Ort der Probenahme	Singlepath® E. coli	Anzüchtung	Latexagglutination	Duopath® Verotoxins
22	05.12.2006	05.12.2006	Hackfleisch Rind	Söllingen	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
23	05.12.2006	05.12.2006	Hackfleisch Rind	Stupferich	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
24	05.12.2006	05.12.2006	Leber Rind	Stupferich	schwach positiv	atypisch	negativ	n. d.
25	06.02.2007	06.02.2007	Hackfleisch Rind	Rauenberg	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
26	06.02.2007	06.02.2007	Hackfleisch Rind	Malschenberg	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
27	06.02.2007	06.02.2007	Ochsenmaulsalat	Malschenberg	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
28	06.02.2007	06.02.2007	Hackfleisch Rind	Bad Schönborn	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
29	06.02.2007	06.02.2007	Hackfleisch Rind	Langenbrücken	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
30	06.02.2007	06.02.2007	Hackfleisch Rind	Ubstadt	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
31	06.02.2007	06.02.2007	Hackfleisch Rind	Büchenau	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
32	06.02.2007	06.02.2007	Ochsenmaulsalat	Büchenau	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
33	06.03.2007	06.03.2007	Hackfleisch Rind	Stutensee	positiv	atypisch	negativ	n. d.
34	06.03.2007	06.03.2007	Hackfleisch Rind	Graben-Neudorf	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
35	06.03.2007	06.03.2007	Leber Rind	Graben-Neudorf	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
36	06.03.2007	06.03.2007	Hackfleisch Rind	Graben-Neudorf	schwach positiv	typisch	positiv	negativ
37	06.03.2007	06.03.2007	Leber Rind	Graben-Neudorf	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
38	06.03.2007	06.03.2007	Hackfleisch Rind	Hochstetten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
39	06.03.2007	06.03.2007	Hackfleisch Rind	Linkenheim	schwach positiv	typisch	positiv	negativ
40	06.03.2007	06.03.2007	Hackfleisch Rind	Leopoldshafen	positiv	typisch	positiv	negativ
41	06.03.2007	06.03.2007	Hackfleisch Rind	Emmendingen	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
42	13.03.2007	13.03.2007	Hackfleisch Rind	Untergrombach	negativ	n. d.	n. d.	n. d.

Fortsetzung Tab.: 8.3

Labor-nummer	Datum der Probenahme	Beginn der Probenuntersuchung	Probenmaterial	Ort der Probenahme	Singlepath® E. coli	Anzüchtung	Latex-agglutination	Duopath® Verotoxins
43	13.03.2007	13.03.2007	Leber Rind	Untergrombach	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
44	13.03.2007	13.03.2007	Hackfleisch Rind	Graben-Neudorf	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
45	13.03.2007	13.03.2007	Hackfleisch Rind	Graben-Neudorf	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
46	13.03.2007	13.03.2007	Hackfleisch Rind	Eggenstein	schwach positiv	atypisch	negativ	n. d.
47	13.03.2007	13.03.2007	Leber Rind	Eggenstein	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
48	13.03.2007	13.03.2007	Hackfleisch Rind	Eggenstein	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
49	13.03.2007	13.03.2007	Leber Rind	Eggenstein	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
50	13.03.2007	13.03.2007	Kalbfleisch	Eggenstein	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
60	26.06.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
61	26.06.2007	26.06.2007	Ochsenmaulsalat	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
62	26.06.2007	26.06.2007	Leber Rind	Stutensee	schwach positiv	typisch	negativ	n. d.
63	26.06.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
64	26.06.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Weingarten	schwach positiv	kein Wachstum	n. d.	n. d.
65	26.06.2007	26.06.2007	Leber Rind	Weingarten	schwach positiv	kein Wachstum	n. d.	n. d.
66	26.06.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Weingarten	schwach positiv	atypisch	negativ	n. d.
67	26.06.2007	26.06.2007	Kalbskotelett	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
68	26.06.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
98	15.02.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.

Anzüchtung/Wachstum: Anzüchtung und Wachstumsverhalten auf CT-SMAC

n. d.: nicht durchgeführt

Tab.: 8.4: Metzgereien - Tiefkühlproben (n = 26)

Labor-nummer	Datum der Probenahme	Beginn der Probenuntersuchung	Probenmaterial	Ort der Probenahme	Singlepath® E. coli	Anzüchtung	Latex-agglutination	Duopath® Verotoxins
54	03.04.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Büchenau	schwach positiv	kein Wachstum	n. d.	n. d.
55	03.04.2007	26.06.2007	Leber Rind	Büchenau	schwach positiv	kein Wachstum	n. d.	n. d.
58	06.06.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Forst	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
59	06.06.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Forst	positiv	kein Wachstum	n. d.	n. d.
69	21.08.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Karlsruhe	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
73	06.11.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	schwach positiv	typisch	positiv	negativ
74	06.11.2007	15.02.2008	Kalbsschnitzel	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
75	06.11.2007	15.02.2008	Leber Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
76	06.11.2007	15.02.2008	Leber Rind	Weingarten	schwach positiv	typisch	positiv	negativ
77	06.11.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
78	06.11.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
79	13.12.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Büchenau	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
80	13.12.2007	15.02.2008	Ochsenmaulsalat	Büchenau	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
83	11.01.2008	15.02.2008	Ochsenmaulsalat	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
84	11.01.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
85	11.01.2008	15.02.2008	Leber Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
86	11.01.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
87	11.01.2008	15.02.2008	Roastbeef	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
88	11.01.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
89	11.01.2008	15.02.2008	Roastbeef	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
90	11.01.2008	15.02.2008	Leber Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
91	11.01.2008	15.02.2008	Ochsenmaulsalat	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.

Fortsetzung Tab.: 8.4

Labor- nummer	Datum der Probenahme	Beginn der Proben- untersuchung	Probenmaterial	Ort der Probenahme	Singlepath® <i>E. coli</i>	Anzüchtung	Latex- agglutination	Duopath® Verotoxins
92	11.01.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
93	11.01.2008	15.02.2008	Kalbsschnitzel	Weingarten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
96	18.01.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Neuthard	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
97	18.01.2008	15.02.2008	Leber Rind	Neuthard	negativ	n. d.	n. d.	n. d.

Anzüchtung/Wachstum: Anzüchtung und Wachstumsverhalten auf CT-SMAC

n. d.: nicht durchgeführt

8.2.3 Ergebnisse der Untersuchung der Proben aus Supermärkten (n = 23)

Tab. 8.5: Supermärkte - Frische Proben (n = 14)

Labornummer	Datum der Probenahme	Beginn der Probenuntersuchung	Probenmaterial	Ort der Probenentnahme	Singlepath® E. coli	Anzüchtung	Latex-agglutination	Duopath® Verotoxins
1	10.10.2006	10.10.2006	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
12	29.11.2006	29.11.2006	Beinscheibe	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
13	29.11.2006	29.11.2006	Hackfleisch Rind	Stutensee	schwach positiv	atypisch	negativ	negativ
14	29.11.2006	29.11.2006	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
15	29.11.2006	29.11.2006	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
16	29.11.2006	29.11.2006	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
17	29.11.2006	29.11.2006	Kalbshals-Gulasch	Stutensee	positiv	atypisch	negativ	negativ
51	13.03.2007	13.03.2007	Hackfleisch Rind	Eggenstein	positiv	atypisch	negativ	negativ
52	13.03.2007	13.03.2007	Roastbeef	Eggenstein	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
53	13.03.2007	13.03.2007	Leber Rind	Eggenstein	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
99	15.02.2008	15.02.2008	Leber Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
100	15.02.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	positiv	typisch	positiv	negativ
101	15.02.2008	15.02.2008	Kalbsschnitzel	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
102	15.02.2008	15.02.2008	Beinscheibe Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.

Anzüchtung/Wachstum: Anzüchtung und Wachstumsverhalten auf CT-SMAC

n. d.: nicht durchgeführt

Tab. 8.6: Supermärkte - Tiefkühlproben (n = 9)

Labornummer	Datum der Probenahme	Beginn der Probenuntersuchung	Probenmaterial	Ort der Probenahme	Singlepath® <i>E. coli</i>	Anzüchtung	Latexagglutination	Duopath® Verotoxins
56	31.05.2007	26.06.2007	Ochsenmaulsalat	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
57	31.05.2007	26.06.2007	Hackfleisch Rind	Stutensee	schwach positiv	kein Wachstum	n. d.	n. d.
70	25.10.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	schwach positiv	atypisch	negativ	negativ
71	02.11.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
72	02.11.2007	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	positiv	typisch	positiv	negativ
81	13.12.2007	15.02.2008	Kalbsschnitzel	Karlsdorf	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
82	13.12.2007	15.02.2008	Roastbeef	Karlsdorf	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
94	11.01.2008	15.02.2008	Hackfleisch Rind	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.
95	11.01.2008	15.02.2008	Roastbeef	Stutensee	negativ	n. d.	n. d.	n. d.

Anzüchtung/Wachstum: Anzüchtung und Wachstumsverhalten auf CT-SMAC

n. d.: nicht durchgeführt

8.2.4 Ringversuch

Abb. 8.4: Ringversuch 2007



LGC, QM and Aquacheck - promoting excellence through proficiency testing

QUALITY IN MICROBIOLOGY SCHEME

ANALYSENANFORDERUNG (ARF)

LABOR-CODENUMMER

MC3238

PROBENNR.: 22D134

LFD. NR.: 134

LIEFERDATUM: 12 Jun 2007

Verwenden Sie Ihre Routine-Analysemethode für den Nachweis von *Escherichia coli* O157

Bitte die Ergebnisse als nachgewiesen / nicht nachgewiesen angeben

RAUM FÜR UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

DATUM PROBE ERHALTEN AM 14.6.07 PROBEGETESTET AM 22.6.07 ERGEBNISMITTEILUNG AM 24.6.07

VERDÜNNUNGSSTUFE IMPFMENGE

BESTÄTIGUNGSMETHODE - BITTE ANKREUZEN FALLS NICHT DURCHGEFÜHRT

.....

IHRE ERGEBNISSE – BITTE IN GROSSBUCHSTABEN EINTRAGEN

Pro Probe dürfen nicht mehr als 10 Ergebnisse notiert werden. Im Bericht werden nicht mehr als 3 Buchstaben/Ziffern für den jeweiligen Untersucher angezeigt.

UNTERSUCHER	METHODE	NÄHRMEDIENABKÜRZUNG	TEMPERATUR °C	BEBRÜTUNGSDAUER (h)	NACHGEWIESEN / NICHT NACHGEWIESEN
KEU	Singlepath® E. coli O157, VNR				NACHGEWIESEN
KEU		CT	37°C	24	NACHGEWIESEN
KEU	Latex Agglutination				NACHGEWIESEN

BESTÄTIGUNGSMETHODE - BITTE ANKREUZEN FALLS NICHT DURCHGEFÜHRT

.....

Die probenbearbeitung nicht später beginnen als:

22 Jun 2007

Eingang der ergebnisse bei QM bis spätestens 17.00 UHR am:

29 Jun 2007

MC3238

Ergebnisübermittlung per:

Post im beigefügten, adressierten Briefumschlag (unteren Durchschlag verwenden)
 Fax an +44 (0) 161 763 4908
 Email: qms@qualitymanagement.co.uk
 Website: http://www.qualitymanagement.co.uk



005003238A

9 LITERATURVERZEICHNIS

ALPERS K.; WERBER D.; FRANK C.; KOCH J.; FRIEDRICH A.; KARCH H.; AN DER HEIDEN M.; PRAGER R.; FRUTH A.; BIELASZEWSKA M.; MORLOCK G.; HEISSENHUBER A.; DIEDLER A.; GERBER A.; AMMON A. (2008)

Sorbitol-fermenting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- causes another outbreak of haemolytic uraemic syndrome in children

Epidemiol Infect.: S.1-7

ALTS (2001)

Lebensmittelrechtliche Beurteilung von verotoxinogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (VTEC/EHEC).

Ergebnisprotokoll **54**. Arbeitstagung des Arbeitskreises der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der vom Tier stammenden Lebensmittel tätigen

Sachverständigen, Berlin, 19.06.-21.06., Top 23

AL-SAIGH, H.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; USERA, M. A.; STEPHAN, R. (2004)

Fecal shedding of *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Campylobacter* in Swiss cattle at slaughter.

J. Food. Prot. **67**(4): S. 679-684.

AMIRLAK, I. und AMIRLAK, B. (2006)

Haemolytic uraemic syndrome: an overview

Nephrology (Carlton); **11**(3): S. 213-218

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**: S. 410-420

BAILEY, J. R.; WARNER, L.; PRITCHARD, G. C.; WILLIAMSON, S.; CARSON, T.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T.; BAILEY, J. R. (2002)

Wild rabbits - a novel vector for Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157

Commun. Dis. Public. Health; **5**(1): S. 74-75.

- BALES, S.; BAUMANN, H. G.; SCHNITZLER, N. (2003)
Infektionsschutzgesetz. Kommentar und Vorschriftensammlung
W. Kohlhammer Verlag, Stuttgart, 42-45, 64-66, 86-93
- BALJER, G.; WIELER, L. H.; BAUERFEIND R.; LUDWIG, S.-B.; MAYR, A. (1990)
Nachweis von Verotoxin (Shiga-like-) toxinbildenden *E. coli*-Keimen (VTEC) mittels
Zellkulturtest und DNA-Hybridisierung bei durchfallkranken Kälbern
Tierärztl. Umsch. **2**, S. 71-78
- BALJER, G.; WIELER, L.H. (1999)
Tiere als Infektionsquelle für den Menschen – durch EHEC hervorgerufene
Erkrankungen
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **106** (8), S. 339-343
- BAUERFEIND, 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 I. EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004, S. 39
- BAUWENS, L.; DE MEURICHY, W.; VERCAMMEN, F. (2000)
Isolation of *Escherichia coli* O157 from zoo animals
Vlaams. Diergeneeskd, Tijdschr. **69**, S. 76-79
- BETTELHEIM, K. A.; BEUTIN, L. (2003)
Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin
producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC)
J. Appl. Microbiol. **95**: S. 205-217
- BETTELHEIM, K. A.; HORNITZKY, M. A.; DJORDJEVIC, S. P.; KUZEVSKI, A.
(2003)
Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-
VTEC isolated from domestic animals and humans
J. Med. Microbiol. **52**: S. 155-162

BETTELHEIM, K. A (2007)

The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens

Crit. Rev. Microbiol. **33**: S. 67-87

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINBRÜCK, 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): S. 2483-2488

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. (1998)

Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany

Emerg. Infect. Dis. **4** (4): S. 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 I. EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004, S. 53

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO M. P.; MORA, A.; DAHBI G.; COÍRA M. A.;
BLANCO, J. (2004)

Serotypes, virulence genes, and intimin type of Shiga toxin (verotoxin) -producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain from 1992 through 1999

J. Clin. Microbiol.; **42**: S. 311-319

BLANCO, M.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; ZWEIFEL, C.; BLANCO, J. E;
DAHBI, G.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. (2005)

Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2)

BMC Microbiol.; **5**: S. 23

BLUM, G.; MARRE, R.; HACKER, J. (1995)

Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6

Infection **23**: S. 234-236

BOCKEMÜHL, J.; KARCH, H.; TSCHÄPE, H. (1997)

Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996

Bundesgesundheitsbl. **6**: S. 194-197

BOCKEMÜHL, J.; KARCH, H.; TSCHÄPE, H. (1998)

Zur Situation der Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1997

Bundesgesundheitsbl. **SH**: S. 2-5

BOLDUC, D.; SROUR, L. F.; SWEET, L.; NEATBY, A.; GALANIS, E.; ISAACS, S.; LIM, G. (2004)

Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall, 2002

Can. Commun. Dis. Rep. **30** (9): S. 81-88.

BOLTEN, F. J.; CROZIER, L.; WILLIAMSON, J. K. (1996)

Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products

Lett. Appl. Microbiol. **23**: S. 317-321

BONARDI, S.; MAGGI, E.; BOTTARELLI, A.; PACCIARINI, M. L.; ANSUINI, A.; VELLINI, G.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A. (1999)

Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy

Vet. Microbiol. **67**: S. 203-211

BOPP, D. J.; SAUDERS, B. D.; WARING, A. L.; ACKELSBERG, J.; DUMAS, N.; BRAUN-HOWLAND, E.; DZIEWULSKI, D.; WALLACE, B. J.; KELLY, M.; HALSE, T.; ARUDA MUSSER, K.; SMITH, P. F.; MORSE, D. L.; LIMBERGER, R. J. (2003)

Detection, isolation and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak

J. Clin. Microbiol. **41**, S. 174-180

BRANDIS, M.; KARCH, H.; ZIMMERHACKL, L. B.; VERWEYEN, H.; GERBER, A. (2002)

Das hämolytisch-urämische Syndrom

Dtsch. Ärztebl. **99**(4), A-196/B-157/C153

BRETT K. N.; RAMACHANDRAN V.; HORNITZKY M. A.; BETTELHEIM K. A.; WALKER M. J.; DJORDJEVIC S. P. (2003)

stx1c 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): S. 926-936

BRINKMANN, A. (2007)

Vorkommen und Kontrolle lebensmittelrelevanter Mikroorganismen und Verbreitung von Shiga Toxin- bildenden *Escherichia coli* in verschiedenen Stadien der Rohwurstherstellung aus konventioneller und ökologischer Produktion

Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

BROOKS, J. T.; SOWERS, E. G.; GREENE, K. D.; GRIFFIN, P. M.; HOEKSTRA R. M.; STROCKBINE, N. A. (2005)

Non-O157-Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002

J. Infect. Dis. **192**: S. 1422-1429

BRUCE, M. G.; CURTIS, M. B.; PAYNE, M. M.; GAUTOM, R. K.; THOMPSON, E. C.; BENNETT, A. L.; KOBAYASHI, J. M (2003)

Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Clark County, Washington, August 1999

Arch. Pediatr. Adolesc. Med. **157**(10): S. 1016-1021

BRUNEAU, A.; RODRIGUE, H.; ISMÄEL, J.; DION, R.; ALLARD, R. (2004)

Outbreak of *E. coli* O157 :H7 associated with bathing at a public beach in the Montreal-centre region

Can. Commun. Dis. Rep. **30**, S. 133-136

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**, S. 380-384

BÜLTE, M.; WROCKLAGE, V. (1992)

Die PCR-Technik zur Ermittlung von verotoxinogenen *E.-coli*-Stämmen bei Schlacht- und Nutztieren

Proc. **22**. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, S. 486-495

BÜLTE, M.; HECKÖTTER, S.; KEIL, P.; SCHUY, C.; MÜLLER, A.; ALEKSIC, S. (1998)

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) - aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? 3. Nachweismöglichkeiten für VTEC und EHEC
Fleischwirtsch. **78**: S. 146-151

BÜLTE, M. (2000)

Versuch einer lebensmittelrechtlichen Beurteilung von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC)

53. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, 14.-15.06.2000

BÜLTE, M., STAHL, A., GOLL, M., KUNZ B., BUBERT, A. (2003)

Singlepath[®] *E. coli* O157 and Duopath[®] Verotoxins: Evaluation of improved immunochromatographic rapid tests for the detection of verocytotoxigenic *E. coli* O157 and non-O157 strains in food
Poster VTEC Conference, Edinburgh

BÜLTE, M., STAHL, A., BUBERT, A. (2003):

Singlepath[®] *E. coli* O157: Entwicklung und Evaluierung eines verbesserten immunologischen Schnelltests zum Nachweis von *E. coli* O157 aus Lebensmitteln
Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, **43**: Part 1 / 2, S. 184-189

BÜLTE, M. (2004)

Prävalenz von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) bei Haustieren
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **111** (8): S. 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): S. 2106-2112

CARPENTER, J. L.; ANDELMANN, N. C.; MOORE, F. M.; KING JR., N. W. (1988)

Idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds

Vet. Pathol. **25**: S. 401-407

CARTER, A. O.; BORCZYK, A. A.; CARLSON, J. A.; HARVEY, B.; HOCKIN, J. C.;

KARMALI, M. A.; KRISHAN, C.; KORN, D. A.; LIOR, H. (1987)

A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home

N. Engl. J. Med.; **317**: S. 1496-1500

CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1983)

International notes outbreak of hemorrhagic colitis – Ottawa, Canada

CDC MMWR Weekly **32** (10): S. 133-134

CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1996)

Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice - British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996

CDC MMWR Weekly **45**: S. 975

CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2001)

Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits - Pennsylvania and Washington, 2000

CDC MMWR Weekly **50**: S. 293-297

CHALMERS, R. M.; SALMON, R. L.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; LOOKER, N.; DAVIES, I.; WRAY, C. (1997)

Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farmer handling horses

Lancet **349**: S. 1816

- CHAPMAN, P. A.; WRIGHT, D. J.; SIDMONS, C. A. (1994)
A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces
J. Med. Microbiol. **40**: S. 424-427
- CHAPMAN, P. A.; SIDMONS, C.A.; CERDÁN MALO, A. T.; HARKIN, M. A. (1997)
A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry
Epidemiol. Infect. **119**: S. 245-250
- CHART, H.; CHEASTY, T. (2008)
Human infections with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157--10 years of *E. coli* O157 serodiagnosis
J. Med. Microbiol. **57** (Pt 11): S.1389-1393.
- CHENG, S. F. ; CHAU, L. K. (2003)
Colloidal gold-modified optical fiber for chemical and biochemical sensing
Anal. Chem. **75** (1): S. 16-21
- CHEUNG, C. Y. (2003)
Charakterisierung der Säureresistenz von verotoxinbildenden *Escherichia coli* (VTEC) und ihre Bedeutung bei der Herstellung von Sauermilcherzeugnissen
Diss. rer. nat., Technische Universität Berlin, Fakultät III-Prozesswissenschaften
http://edocs.tu-berlin.de/diss/2003/CHEUNG_chiyeun.pdf
- CONEDERA, G.; MARANGON, S.; CHAPMAN, P. A.; ZUIN, A.; CAPRIOLI, A. (1997)
Atypical strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef cattle at slaughter in Veneto region, Italy
J. Vet. Med. **44**: S. 301-306
- COWDEN, J. M.; AHMED, S.; DONAGHY, M.; RILEY, A. (2001)
Epidemiological investigation of the Central SCOTLAND outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996
Epidemiol. Infect. **126**: S. 335-341

CUDJOE, K. S.; PATEL, P. D.; OLSEN, E.; SKJERVE, E. OLSVIK, Ø. (1993)
Immunomagnetic separation techniques for the detection of pathogenic bacteria in foods

In: Kroll, R. G.; Sussmann, M., Gilmour A. (Hrsg.): New Techniques in Food and Beverage Microbiology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, S. 17-29

DE BOER, E.; HEUVELINK, A. E. (2000)

Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. **29**: S. 133S-143S

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): S. 4560-4563

DOW, M. A.; TÓTH, I.; MALIK, A.; HERPAY, M.; NÓGRÁDY, N.; GHENGHESH, K. S.; NAGY, B. (2006)

Phenotypic and genetic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and entero-aggregative *E. coli* (EAEC) from diarrhoeal and non-diarrhoeal children in Libya

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **29** (2-3): S. 100-113
Epub 2006 Apr 19.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. (1987)

Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry
Appl. Environ. Microbiol. **53** : S. 2394-2396

ERICKSON, J. P.; STAMER J. W.; HAYES M.; MCKENNA D. N.; VAN ALSTINE L. A. (1995)

An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings

J. Food Protec. **58** (10): S. 1059-1064

ESCHERICH, T. (1885)

Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings
Fortschr. Med. **3**: S. 514-557

ETHELBERG, S.; OLSEN, K. E.; SCHEUTZ, F.; JENSEN, C.; SCHIELLERUP, P.; ENBERG, J.; PETERSEN, A. M.; OLESEN, B.; GERNER-SCHMIDT, P.; MOLBAK, K. (2004)

Virulence factors for haemolytic uremic syndrome, Denmark
Emerg. Infect. Dis **10**: S. 842-847

FA. MERCK, DARMSTADT

MERCK Microbiology Manual **12th** Edition, S. 614 - 615 / S. 623 – 626

FENWICK, B. W.; CONWAN, L. A. (1998)

Canine model of hemolytic-uremic syndrome

In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Hrsg.)

Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains

American Society for Microbiology, Washington, D. C., S. 268-277

FRANK, C.; ALPERS, K. (2003)

Infektionen mit EHEC des 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.; WERBER, D. (2007)

Epidemiologie von EHEC-Gastroenteritis und EHEC-assoziiertem hämolytisch urämischem Syndrom in Deutschland – Analyse der Meldedaten 2001-2005

Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 14

FRATAMICO, P. M.; SCHULTZ, F. J.; BUCHANAN, R. L. (1992)

Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an immunomagnetic separation method

Food microbiol. **9**: S. 105-113

FRIEDRICH, A. W. (2002)

Variabilität der Shiga Toxine in *Escherichia coli*

Hyg. Mikrobiol. **6**, S. 99-104

FRIEDRICH, A.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; PULZ, M.; KUCZIUS, T.; AMMON, A.; KARCH, H. (2002)

Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms

J. Inf. Dis. **185**: S. 74-84

FRIEDRICH, A.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; MELLMANN, A.; KARCH, H., (2007a)

Bedeutung von Sorbit-fermentierenden *E. coli* O157:H- als Krankheitserreger

Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007 Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai 2007, S. 55

FRIEDRICH, A.; ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; KARCH, H. (2007b)

Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in humans

Clin. Infect. Dis. **45**: S. 39-45

FRUTH, A.; PRAGER, R.; FRIEDRICH, A.; KUCZIUS, T.; ROGGENTIN, P.; KARCH, H.; AMMON, A.; BOCKEMÜHL, J.; TSCHÄPE, H. (2002)

Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland von 1998-2001

Bundesgesundhbl. **45**: S. 715-721

FRUTH, A.; PRAGER, R.; SAGEBIEL, D.; FRANK, C.; ALPERS K.; DREESMANN, J.; PULZ M.; FRIEDRICH A.; SPEICHER A.; ROGGENTIN P. (2007)

HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische *E. coli* O157:H- in Norddeutschland im Frühjahr/Sommer 2006

Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 18

GARCÍA, A.; MARINI, R. P.; FENG, Y.; VITSKY, A.; KNOX, K.A.; TAYLOR, N. S.; SCHAUER D. B.; FOX, J. G. (2002)

A naturally occurring rabbit model of enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced disease

J. Infect. Dis. **186** : S. 1682-1686

GARCÍA, A.; FOX, J. G. (2003)

The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Emerg. Infect. Dis. **9**: S. 1592-1597

- 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): S.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 I. EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004, S. 35
- GOLL, M. (2005)
Nachweis und DNA-Fingerprinting von *Escherichia coli* O157-Stämmen bei Pferden
Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen
- GYLES, C. L. (2007)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview
J. Anim. Sci. **85** (E. Suppl.): E. 45-62
- HAACK, S. K.; DURIS, J. W.; FOGARTY, L. R.; KOLPIN, D. W.; FOCAZIO, M. J.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T. (2009)
Comparing wastewater chemicals, indicator bacteria concentrations, and bacterial pathogen genes as fecal pollution indicators.
J. Environ. Qual. **38**(1): S. 248-258.
- 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. 165-1764, BfR Pressestelle, 14195 Berlin, Germany
- HECKÖTTER, S. (1999)
Vergleichende Untersuchung zum Nachweis von *E. coli* O157:H7-Stämmen aus künstlich kontaminiertem Rinderhackfleisch unter besonderer Berücksichtigung der immunomagnetischen Separation (IMS)
Diss. vet. med., Justus-Liebig-Universität, Gießen

HERTZKE, D. M., CONWAN, L. A., SCHONING, P., FENWICK, B. W. (1995)
Glomerular ultrastructural lesions of idiopathic cutaneous and renal glomerular
vasculopathy of greyhounds
Vet. Pathol. **32**: S. 427-436

HESS, R. D.; LIESKE, R.; KLOPFER, G.; ACHESON, D. W. K. (1999)
Conclusions from a questionnaire on STEC/VTEC diagnostics in the Federal
Republic of Germany
J. Lab. Med. **23**: S. 427-436

HOLT, J.; KRIEG, N.; SNEATH, P.; STALEY, J.; WILLIAMS, S. (1994)
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
Williams & Wilkins Verlag, **9**. Auflage, S. 179-180

HUBER, H. C.; KUGLER, R.; LIEBL, B. (1998)
Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) - Ergebnisse einer
epidemiologischen Erhebung in Bayern für den Zeitraum April 1996 bis März 1997
Gesundheitswesen **60**: S. 159-165

HUPPERTZ, H. I.; BUSCH, D.; SCHMIDT, H.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. (1996)
Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that
produce Shiga-like toxin.
J. Pediatr.; **128**(3): S. 341-346

JANKA, A.; BIELASZEWSKA, M.; DOBRINDT, U.; GREUNE, L.; SCHMIDT, M. A.;
KARCH H. (2003)
Cytotoxic distending toxin gene cluster in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*
O157:H- and O157:H7 characterization and evolutionary considerations
Infect. Immun. **71**(6): S. 3624-3638

JENKINS, C.; PEARCE, M. C.; SMITH, A. W.; KNIGHT, H. I.; SHAW, D. J.;
CHEASTY, T.; FOSTER, G.; GUNN, G. J.; DOUGAN, G.; SMITH, H. R.; FRANKEL,
G. (2003)
Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 from bovine
faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques.
Lett. Appl. Microbiol. **37**: S. 207-212

JENSEN, C.; ETHELBERG, S.; OLESEN, B.; SCHIELLERUP, P.; OLSEN, K.E.; SCHEUTZ, F.; NIELSEN, E.M.; NEIMANN, J.; HØGH, B.; GERNER-SMIDT, P.; MØLBAK, K.; KROGFELT, K. A. (2007)

Attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from Danish children: clinical significance and microbiological characteristics.

Clin. Microbiol. Infect. **13** (9): S. 863-872.

JOHNSEN, G.; WASTESON, Y.; HEIR, E.; BERGET, O. I.; HERIKSTAD, H. (2001)
Escherichia coli O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwestern part of Norway during 1998 and 1999

Int. J. Food Microbiol. **65**: S. 193-200

JOHNSON, K. E.; THORPE, C. M.; SEARS, C. L. (2006)

The emerging clinical importance of non-O157-Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Clin. Infect. Dis. **43**: S. 1587-1595

KHAITAN, A.; JANDHYALA, D. M.; THORPE, C. M.; RITCHIE, J. M.; PATON, A. W (2007)

The operon encoding SubAB, a novel cytotoxin, is present in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from the United States

J. Clin. Microbiol. **45**: S 1374-1375

KHAN, A.; NANDI, R. K.; DAS, S. C.; RAMAMURTHY, T.; KHANAM, J.; SHIMIZU, T.; YAMASAKI, S.; BHATTACHARYA, S. K.; CHAICUMPA, W.; TAKEDA, Y.; BALAKRISH NAIK, G. (2003)

Environmental isolates of *Citrobacter braakii* that agglutinate with *Escherichia coli* O157 antiserum but do not possess the genes responsible for the biosynthesis of O157 somatic antigen

Epidemiol. a. infect. **130** (2): S. 179-186

KAPER, J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. (2004)

Pathogenic *Escherichia coli*

Nat. Rev. Microbiol. **2** (2): S. 123-140.

KARCH, H.; STROCKBINE, N.; O'BRIEN, A. D. (1986)

Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim-sufamethoxazole facilitates detection of Shiga-like producing strains by colony blot assay

FEMS Microbiol. Lett. **35**: S. 141-145

KARCH, H.; WISS, R.; GLONING, H.; EMMRICH, P.; ALEKSIC, S.; BOCKEMÜHL, J. (1990)

Hämolytisch-urämisches Syndrom bei Kleinkindern durch Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*

Dtsch. Med. Wochenschr. **115**: S. 489-495

KARCH, H.; BÖHM, H.; SCHMIDT, H.; GUNZER, F.; ALEKSIC, S.; HEESEMANN, J. (1993)

Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-

J. Clin. Microbiol.; **31** (5): S.1200-1205.

KARCH, H.; JANETZKI-MITTMANN, C.; ALEKSIC, S.; DATZ, M. (1996)

Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods and direct culture

J. Clin. Microbiol. **34**: S. 516-519

KARCH, H.; KOHLER, B. (1999)

Neue Erkenntnisse über die Molekularbiologie von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* EHEC O157

Gesundheitswesen **61**(1): S. 46-51

KARCH, H.; BOCKEMÜHL, J.; HUPPERTZ, H.-I. (2000)

Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

Dtsch. Arztebl. **97** (36): A-2314 / B-2004 / C-1862

KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M. (2001)

Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis

J. Clin. Microbiol. **39**: S. 2043-2049

KARMALI, M. A. (1989)

Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*

Clin. Microbiol. Rev. **2** (1): S.15-38

KARMALI, M. A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J. B. (2003)
 Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease
 J. Clin. Microbiol. **41**: S. 4930-4940

KAVANAGH, D.; GOODSHIP, T. H.; RICHARDS, A. (2006)
 Atypical haemolytic uraemic syndrome
 Br. Med. Bull.; **77-78**: S. 5-22.
 Epub 2006 Sep 11. Links

KAYSER, F. H. (1998)
 Allgemeine Bakteriologie
 In: KAYSER, F. H.; Bienz, K. A. ; Eckert, J.; Zinkernagel, R. M.:
 Medizinische Mikrobiologie, **10.** Auflage
 S. 154-238, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

KAYSER, F. H. (2001)
Escherichia coli
 In: KAYSER, F. H.; Bienz, K. A. ; Eckert, J.; Zinkernagel, R. M.:
 Medizinische Mikrobiologie, **10.** Auflage
 S. 303-306, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

KIRSCH, P.; JORES, J.; WIELER, L. W. (2004)
 Platstizität bakterieller Genome: Pathogenitätsinseln und der Locus of Enterocyte Effacement (LEE)
 Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **117**: S. 116-119

KÖHLER, W.; EGGERS, H.; FLEISCHER, B.; MARRE R.; PFISTER H.; PULVERER, G. (2001)
 Medizinische Mikrobiologie
 Urban & Fischer, München-Jena, **8.** Auflage, S. 299

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. (1977)
 Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*
 Infect. Immun. **18**: S.775-779

- LAI, N. S.; WANG, C. C.; CHIANG, H. L.; CHAU, L. K. (2007)
Detection of antinuclear antibodies by a colloidal gold modified optical fiber
comparison with ELISA
Anal. Bioanal. Chem. **388** (4): S. 901-907
- LEHMACHER, A.; MEIER, H.; ALEKSIC, S.; BOCKEMÜHL, J. (1998)
Detection of hemolysin variants of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and
culture on vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar
Appl. Environ. Microbiol. **64**: S. 2449-2453
- LEHMANN, S.; TIMM, M.; STEINBRÜCK, H.; GALLIEN, P. (2003)
Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) in Kot von Hochwild und
Wildfleischproben
Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor *E. coli* (NRL-Ec), Dessau
- LEJEUNE, J. T.; HANCOCK, D. D. ; BESSER, T. E. (2006)
Sensitivity of *Escherichia coli* O157 detection in bovine feces assessed by broth
enrichment followed by immunomagnetic separation and direct plating methodologies
J. Clin. Microbiol. **44**: S. 872-875
- LISSNER, R.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. (1996)
A standard immunoglobulin preparation produced from bovine colostrum shows
antibody reactivity and neutralization activity against Shiga-like toxins and EHEC-
hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7
Infection.; **24** (5): S. 378-383
- LÖFFLER, G. (1998)
Replikation und Gentechnik
In: LÖFFLER G.; PETRIDES P. E. (1998)
Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage, S. 205-238
- LÜCKE, F.-K. UND TEN BOSCH, C. (1998)
Möglichkeiten und Grenzen für den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
zum Nachweis und zur Typisierung lebensmittelhygienischer relevanter Bakterien
Dtsch. Lebensmittel-Rundsch. **94**: S. 182-187

MA, Y.; MAO, X.; LI, J.; LI, H.; FENG, Y.; CHEN, H.; LUO, P.; GU, J.; YU, S.; ZENG, H.; GUO, G.; YANG, K.; ZOU, Q. (2008)

Engineering an anti-Stx2 antibody to control severe infections of EHEC O157:H7
Immunol. Lett. **121** (2): S. 110-115

MACKENZIE, A. M. R.; TAYLOR, W. E.; GILBERT, W. E. (1948)

Recent experiments in the rapid identification of Bacterium *coli* type I
J. Gen. Microbiol. **2**: S. 197-204

MARCH, S. B.; RATNAM, S. (1986)

Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis
J. Clin. Microbiol. **23**: S. 869-872

MCDONALD, D. M.; FYFE, M.; PACCAGNELLA, A.; TRINIDAD, A.; LOUIE, K.; PATRICK, D. (2004)

Escherichia coli O157:H7 outbreak linked to salami, British columbia, Canada, 1999
Epidemiol. Infect. **132**: S. 283-289

MCINGVALE, S. C.; ELHANAFI, D.; DRAKE, M. A. (2002)

Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*
Appl. Environ. Microbiol.; **68**: S. 799-806

MECHIE, S. C.; CHAPMANN, P. A.; SIDDONS, C. A. (1997)

A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd
Epidemiol. Infect. **118**: S. 17-25

MELLMANN, A.; BIELASZEWSKA, M.; BORELL, J.; BÖHLER, O.; KARCH, H.; FRIEDRICH A. W. (2004)

Prävalenz und Strukturanalyse von Shiga Toxin 1- und 2-Varianten bei enterohämorrhagischen *Escherichia coli*
Tagungsband I. EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli, S. 67

MERAZ, I. M.; JIANG, Z. D.; ERICSSON, C. D.; BOURGEOIS, A. L.; STEFFEN, R.; TAYLOR, D. N.; HERNANDEZ, N.; DUPONT, H. L. (2008)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diffusely adherent *E. coli* as likely causes of a proportion of pathogen-negative travelers' diarrhea--a PCR-based study.

J. Travel. Med. **15** (6): S. 412-418.

MESSELHÄUSSER, U. (2005)

Nachweis von Shiga Toxin-bildenden *Escherichia coli* und termophilen *Campylobacter* species bei Almkühen und in auf Almen produzierten Lebensmitteln
Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

MORGAN, G. M.; NEWMAN, C.; PALMER, S. R.; ALLEN, J. B.; SHEPHERD, W.; RAMPLING, A. M.; WARREN, R. E.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R. (1988)

First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK

Epidemiol. Infect. **101**: S. 83-91

MORINAGA, N.; YAHIRO, K.; MATSUURA, G.; WATANABE, M.; NOMURA, F.; MOSS, J.; NODA, M. (2007)

Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*

Infect. Immun. **75**: S. 488-496

MORLOCK, G. (2002)

Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Bayern, 01.04.1996 – 31.03.2002,

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

MÜLLER, A.; BÜLTE, M. (1997)

Wachstumsverhalten von verotoxinogenen/enterohämorrhagischen *Escherichia coli*- (VTEC-/EHEC-)Stämmen in verschiedenen Anreicherungen mit und ohne Antibiotikazusatz

Proc. 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG),

Eigenverlag der DVG, Gießen, S. 515-519

NATARO, J. P.; KAPER J. B. (1998)

Diarrheagenic *Escherichia coli*

Clin. Microbiol. Rev.; **11**(1): S. 142-201

Erratum in: Clin. Microbiol. Rev. Apr. 1998;11(2): S. 403

NIETSCH, D. D.; RÜEGGER, S.; LEHMANN, T.; LAISSUE, J. A.; FREY, F. J. (2001)

Hämolytisch-urämisches Syndrom mit akutem irreversiblen Nierenversagen und Pankreatitis nach Einnahme von nichtsteroidalen Entzündungshemmern bei Sklerodermie

Schweiz. Med. For. Nr. **10**: S. 246-250

O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D. ; THOMPSON, M. R. ; FORMAL, S. B. (1982)

Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*

J. Infect. Dis.; **146**: S. 763-769

OKREND, A. J. G.; ROSE, B. E.; BENNETT, B. (1990)

A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef

J. Food Prot. **53**: S. 249-252

OLSEN, J. E.; AABO, S.; HILL, W.; NOTERMANS, S.; WERNARS, K.; GRANUM, P. E.; POPOVIC, T.; RASMUSSEN, H. N.; OLSVIC, Ø. (1995)

Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens

Int. J. Food Microbiol. **28**: S. 1-78

ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. (1992)

Escherichia coli serotyping and disease in man and animals

Can. J. Microbiol. **38** (7): S. 699-704

ORTH, D.; GRIF, K.; KHAN, A. B.; NAIM, A.; DIERICH, M. P.; WÜRZNER, R. (2007)

The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro is the determinant factor in the appearance of the haemolytic uraemic syndrome

Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 22

ORTH, D.; GRIF, K.; ZIMMERHACKL, L. B.; WÜRZNER, R. (2009)

Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Austria

Wien. Klin. Wochenschr. **121** (3-4): S. 108-112

OSEK, J. (2004)

Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans, cattle and pigs

Vet. Med. Czech. **49**: S. 317-326

OSEK, J. (2006)

Identification of the subtilase cytotoxin gene among Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources.

Bull. Vet. Inst. Pulawy **50**, S 29-33

PARK, C. H., KIM, H. J., HIXON, D. L., BUBERT, A. (2003)

Evaluation of the Duopath[®] Verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools.

J. Clin. Microbiol. **41** (6): S.2050-2053

PARK, C. H.; MARTIN, E. A.; WHITE, E. L. (1998)

Isolation of a nonpathogenic strain of *Citrobacter sedlakii* which expresses *Escherichia coli* O157 antigen

J. Clin. Microbiol. **36** (5): S. 1408-1409

PARSOT, C. (2005)

Shigella spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors

FEMS Microbiol. Lett. **252** (1): S. 11-18

Epub 2005 Sep 15.

PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; TALBOT, U. M.; WANG, H.; PATON, J. C (2004)

A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*

J. Exp. Med. **1**(200): S. 35-46

PATON, A. W.; PATON, J. C. (2005)

Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin

J. Clin. Microbiol. **43**: S. 2944-2947

PEARCE, M. C.; JENKINS, C.; VALI, L.; SMITH, A. W.; KNIGHT, H. I.; CHEASTY, T.; SMITH, H. R.; GUNN, G. J.; WOOLHOUSE, M. E.; AMYES, S. G.; FRANKEL, G. (2004)

Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145 and O157 in a cohort of beef calves and their dams
Appl. Environ. Microbiol. **70**: S. 1708-1716

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.; GROTBRECK, 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**: S. 529-533

PERSSON, S.; OLSEN, K. E. P.; ETHELBERG, S.; SCHEUTZ, F. (2007)

Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations
J. Clin. Microbiol. **45**: S. 2020-2024

PETRIDES, P. E. (1998)

Gendiagnostik und Gentherapie

In: LÖFFLER G.; PETRIDES P. E. (1998)

Biochemie und Pathobiochemie, **6**. Auflage, S. 317-356

PICHNER, R.; HECHELMANN, H.-G., STEINRÜCK, H.; GAREIS, M. (2001)

Verotoxinbildende *E. coli* (VTEC) und *E.-coli*-Keimzahlen in frischen, streichfähigen Rohwürsten

Fleischwirtsch. **81**: S. 191-192

PRAGER, R.; ANNEMÜLLER, S.; TSCHÄPE, H. (2005)

Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases - need for more detailed diagnostics

Int. J. Med. Microbiol. **295**: S. 29-38

RATNAM, S.; MARCH, S. B.; AHMED, R.; BEZANSON, G. S.; KASATIYA, S. (1988)
Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7
J. Clin. Microbiol. **26**: S. 2006-2012

RENZ, V. (2007)
Lebensmittelrechtliche Beurteilung und zu ergreifende Maßnahmen beim Nachweis
von VTEC in frischem Hackfleisch in Fertigpackungen (mit Erhitzungshinweis)
J. Verbr. Lebensm. **1** (2): S. 207-208

REUTER, G. (1996)
Mikrobiologie des Fleisches
In: Weber, H. (Hrsg.), Mikrobiologie der Lebensmittel, Fleisch und
Fleischerzeugnisse,
1. Aufl., Behr, Hamburg, S. 1-108

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): S. 121-127

RILEY, L., REMIS, R.; HELGERSON, S.; MCGEE, H., WELLS, J.; DAVIS, B.,
HEBERT, R.; OLCOTT, E.; JOHNSON, L.; HARGRETT, N.; BLAKE, P.; COHEN, M.
(1983)
Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype
N. Engl. J. Med. **308** (12): S. 681-685.

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 I. EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004, S. 26

ROLLE, M.; MAYR, A. (2007)
Gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. überarbeitete
Auflage
Hrsg.: Mayr, A.; S. 426-436

ROSSER, T.; DRANSFIELD, T.; ALLISON, L.; HANSON, M.; HOLDEN, N.; EVANS, J.; NAYLOR, S.; LA RAGIONE, R.; LOW, J. C.; GALLY, D. L. (2008)

Pathogenic potential of emergent Sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM
Infect. Immun. **76** (12): S. 5598-5607

SANCAK, A. A.; RUTGERS, H. C.; HART, C. A.; BATT, R. M. (2004)

Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea
Vet. Rec. **154**: S. 101-106

SANDER, A. (2002)

Untersuchungen zum Vorkommen von verotoxinogenen *Escherichia coli* (VTEC) und
Salmonella spp. In Pferdefaeces und -fleischproben
Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. (1995)

Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7
strain EDL 933
Infect. Immun. **63**: S. 1055-1061

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): S.1205-1208

SCHRANNER, S.; HÖRMANSDORFER, S.; BOGER, K.-H.; BUSCH, U.; SING, A. (2007)

Fallbericht: Eine Hauskatze als Ausscheider von EHEC
Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 62

SCHREIBER, C.; WOLF, S.; MEINDL, K.; SCHALCH, B.; SING, A.; BUSCH, U. (2007)

Untersuchung von humanen Stuhlproben und Umgebungsproben auf EHEC im Jahr
2006 in Bayern
Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 55

SCHREIBER, C. (2008)

Genotypische und phänotypische Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden und enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-Isolaten von Mensch, Tier, Lebensmittel und Wasser in Bayern im Zeitraum von 2002-2006

Diss. med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München

SCOTLAND, S.; WILLSHAW, G.; SMITH, H.; ROWE, B. (1990)

Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification

J. Infect. Dis. **162** (5): S. 1069-1074.

SELBITZ, H.-J. (2002)

Bakterielle Krankheiten der Tiere: *Escherichia coli*

In: ROLLE M., Mayr. A. (Hrsg.):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre (7. Auflage)

S. 472-432, Enke Verlag, Stuttgart 2002, Germany

SHERIDAN, G. E.; MASTERS, C. I.; SHALLCROSS, J. A.; MCKEY, B. M. (1998)

Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells

Appl. Environ. Microbiol. **64**: S. 1313-1318

SMITH, D. R.; MOXLEY.; R. A, PETERSON, R. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.;

ERICKSON, G. E.; CLOWSER, S. L. (2008)

A two-dose regimen of a vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 type III secreted proteins reduced environmental transmission of the agent in a large-scale commercial beef feedlot clinical trial

Foodborne Pathog. Dis. **5** (5): S. 589-598

STAHL, A.; BÜLTE, M. (2000a)

Enhancer zum verbesserten Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli* (VTEC)

Proc. 41. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Eigenverlag der DVG, Gießen, S. 412-125

- STAHL, A.; BÜLTE, M. (2000b)
Verotoxin bildende *Escherichia coli* (VTEC) in Lebensmitteln – Untersuchungen zum quantitativen Nachweis mittels Koloniehybridisierung
Fleischwirtsch. **80**: S. 99-101
- STARK, K., FRANK, C.; KAPFHAMMER, S.; WERBER, D.; HELD, L. (2007)
Rinderdichte – Ein Risikofaktor für viele, aber nicht alle Serogruppen Shigatoxin produzierender *Escherichia coli* in Deutschland
Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 31
- STEPHAN, R. ; BEUTIN, L. ; BLANCO, J. ; ZWEIFEL, C. (2007)
Finished pigs - an animal reservoir for O157 and non-O157 STEC
Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 29
- SZABO, R. A. ; TODD, E. C. D.; JEAN, A. (1986)
Method to isolate *Escherichia coli* O157 :H7 from food
J. Food Prot. **49**: S. 768-772
- THAMM, B. (2000)
Untersuchungen zur Prävalenz und pathogenen Bedeutung enterohämorrhagischer, enteroaggregativer und enteroinvasiver *Escherichia coli* beim Hund
Diss. med. vet. Tierärztliche Hochschule Hannover, 2007
- 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
Bundesgesundhbl. **41**: S. 20-25
- TREVANA, W. B.; HOOPER, R. S.; WRAY, C.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; DOMINGUE, G. (1996)
Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals
Vet. Rec. **138**: S. 400

TSUJI, T.; SHIMIZU, T.; SASAKI, K.; TSUKAMOTO, K.; ARIMITSU, H.; OCHI, S.; SHIMIZU, T.; TANIGUCHI, K.; NODA, M.; NERI, P.; MORI, H. (2008)

A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2

Vaccine. **26** (17): S. 2092-1099.

VARELA, G.; CHINEN, I.; GADEA, P.; MILIWEBSKY, E.; MOTA, M. I.; GONZÁLEZ, S.; GONZÁLEZ, G.; GUGLIADA, M. J.; CARBONARI, C. C.; ALGORTA, G.; BERNADÁ, M.; SABELLI, R.; PARDO, L.; RIVAS, M.; SCHELOTTO, F. (2008)

Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from clinical cases and food in Uruguay

Rev. Argent. Microbiol. **40** (2): S. 93-100

WEINSTEIN, D. L.; JACKSON, M. P.; SAMUEL, J. E.; HOLMES, R. K.; O'BRIEN, A. D. (1998)

Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin typ II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine

J. Bacteriol. **170**: S. 4223-4230

WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; WACHSMUTH, I. K.; RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; SOKOLOW, R.; MORRIS, G. K. (1983)

Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype

J. Clin. Microbiol. **18**: S. 512-520

WERBER, D.; FRUTH, A.; BUCHHOLZ, U.; PRAGER, R.; KRAMER, M.; AMMON, A.; TSCHÄPE, H. (2003)

Strong association between shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes stx2 and eae as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **22** (12): S. 726-730

Epub. 12. Nov. 2003

WHO (World Health Organization) (1998)

Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting, Berlin, Deutschland, 23.-26. Juni, 1998

WHO/CSR/APH/98.8

WILLSHAW, G. A.; EWANS, J.; CHEASTY, T.; CUMMINS, A.; PRITCHARD, G. C. (2003)

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection and private farm visits
Vet. Rec. **152**: S. 365-366

WRIGHT, D. J.; CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A. (1994)

Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolation *Escherichia coli* O157 from food samples
Epidemiol. Infect. **113**: S. 31-39

ZADIK, P. M.; CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A. (1993)

Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157
Med. Microbiol. **39**: S. 155-158

ZHANG, W. L.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH H. (2002)

Identification, characterization and distribution of a Shiga Toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans
J. Clin. Microbiol. **40** (4): S. 1441-1446

ZHANG, W. L.; BIELASZEWSKA, M.; FRIEDRICH, A. W., KUCZIUS, T.; KARCH H. (2004)

Transkriptionsanalyse von Shiga Toxin 2 Gen-Varianten in *Escherichia coli*-Stämmen
Tagungsband I. EHEC-Workshop, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004, S. 68

ZHU, C.; YU, J.; YANG, Z.; DAVIS, K.; RIOS, H.; WANG, B.; GLENN, G.; BOEDEKER, E. C. (2008)

Protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin subunit B
Clin. Vaccine. Immunol. **15** (2): S. 359-366

ZIMMERHACKL, L. B.; GERBER, A.; PEDIWILLA, P.; SCHEIRING, J.; MARTINI, S.; ORTH, D.; PETZLBERGER, B.; OBERAIGNER, W.; WÜRZNER, R.; KARCH, H. (2007)

Epidemiologie des EHEC assoziierten HUS
Epidemiology of EHEC associated Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS)
Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11. Mai, S. 22

ZWEIFEL, C.; ZYCHOWSKA, M. A.; STEPHAN, R. (2004)
Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland.
Int. J. Food Microbiol.; **92** (1): S. 45-53

Gesetze, Verordnungen, Richtlinien und Leitlinien

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB
Untersuchung von Lebensmitteln, Nachweis, Isolierung und Charakterisierung
Verotoxin- bildender *Escherichia coli*
(VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA- Hybridisierungstechnik
Methode L. 07.18.1
Beuth, Berlin

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB
Untersuchung von Lebensmitteln, Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales
Verfahren für den Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Lebensmitteln
Methode L. 00.00.68
Beuth, Berlin

AMTLICHE SAMMLUNG VON UNTERSUCHUNGSVERFAHREN NACH § 64 LFGB
Untersuchung von Lebensmitteln, Nachweis von *Escherichia coli* O157 in Fleisch
und Fleischerzeugnissen
Methode L. 06.00.44
Beuth, Berlin

ANONYMUS (2004)
Verordnung zur Änderung tierseuchen- und lebensmittelrechtlicher Vorschriften zur
Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern
Bundesgesetzbl. Teil I, S. 2791

FLEISCHHYGIENEVERORDNUNG - FIHV (2001)
Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen
beim Verkehr von Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung)
Zuletzt geändert am 09.11.2004
Bundesgesetzbl. Teil I, S.1366

GESETZ ZU VERHÜTUNG UND BEKÄMPFUNG VON INFEKTIONSKRANKHEITEN
BEIM MENSCHEN - IfSG (2000)
Vom 20. Juli 2000
Bundesgesetzblatt I, S. 1045

LEBENSMITTEL- BEDARFSGEGENSTÄNDE UND FUTTERMITTELGESETZBUCH
(2007)

Vom 1. September 2005

Bundesgesetzblatt I, S. 2618 (2007)

LEBENSMITTEL-HYGIENEVERORDNUNG (2008)

vom 5. August 1997

Bundesgesetzblatt I, 2008

MILCHVERORDNUNG - MilchV (2000)

Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse
auf Milchbasis (Milchverordnung)

Zuletzt geändert am 09.11.2004

Bundesgesetzbl. Teil I, S. 1178

RICHTLINIE 2006/7/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES
(2006)

über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung und zur Aufhebung
der Richtlinie 76/160/EWG; L 64/37

TIERISCHE LEBENSMITTEL-HYGIENEVERORDNUNG - Tier-LMHV (2007)

Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und
Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Artikel 2 V. v. 08.08.2007 BGBl. I S. 1816, 1828; Geltung ab 15.08.2007

TRINKWASSERVERORDNUNG - TrinkwV (2001)

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch

Trinkwasserverordnung

Bundesgesetzbl. Teil I, S. 959

VERORDNUNG (EG) 2073/2005 ÜBER MIKROBIOLOGISCHE KRITERIEN FÜR
LEBENSMITTEL

vom 15. 11. 2005

ABI. L 338/1

VERORDNUNG (EG) NR. 852/2004
des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004
ÜBER LEBENSMITTELHYGIENE
ABI. L139, S. 206

VERORDNUNG (EG) Nr. 853/2004
des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004
MIT SPEZIFISCHEN HYGIENEVORSCHRIFTEN FÜR LEBENSMITTEL
TIERISCHEN URSPRUNGS
ABI. L 226, S. 22

VERORDNUNG (EG) Nr. 854/2004
des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004
MIT BESONDEREN VERFAHRENSVORSCHRIFTEN FÜR DIE AMTLICHE
ÜBERWACHUNG VON ZUM MENSCHLICHEN VERZEHR BESTIMMTEN
ERZEUGNISSEN TIERISCHEN URSPRUNGS
ABI. L 226, S. 83

VERORDNUNG ÜBER MELDEPFLICHTIGE TIERKRANKHEITEN -
TIERSEUCHENV (2005)
Vom Dezember 2005; BGBl. I S. 3516

Internet

AOAC INTERNATIONAL

www.aoac.org

BETTELHEIM, K. A (2000, 2003)

Serotypes of VTEC

The VTEC Table

<http://www.microbionet.com.au/vtetable.htm>

Datum des Zugriffs: 04.02.2009

BIONICHE LIFE SCIENCES INC. (2008)

Weltweit erster Rinderimpfstoff zur Reduzierung der Bedrohung durch *E. coli* O157 erhält in Kanada umfassende Lizenzgenehmigung

Pressemitteilung der Bioniche Life Sciences Inc. vom 27.10.2008

<http://www.presseportal.de/meldung/1290024/>

CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2006)

Multistate Outbreak of *E. coli* O157 Infections Linked to Taco Bell, Nov.-Dez. 2006

<http://www.CDC.gov/ecoli/2006/december/index.ht>

Zugriff auf homepage am 4.2.2009

CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2007)

Investigation of Outbreak of Human Infection Caused by *E. coli* O157:H7

<http://www.CDC.gov/ecoli/2007/october/103107.html>

Stand 1. Nov. 2007; Zugriff auf homepage am 4.2.2009

CDC - CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2008)

Investigation of Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections

<http://www.CDC.gov/ecoli/june2008outbreak/>

Stand 18. Juli, 2008; Zugriff auf homepage am 4.2.2009

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

HEISSENHUBER, A.; HAUTMANN, W.; LUDWIG M. S.; BUSCH, U.; WILDNER, M. (2005)

Leitfaden Labordiagnostik von Shigatoxin-bildenden und anderen darmpathogenen *Escherichia coli*-Stämmen.

Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

<http://www.lgl.bayern/publikationen/index.htm>

Datum des Zugriffs: 04.02.2009

MANAFI, M. (2000)

Die Diagnostik enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) in Lebensmitteln – Aktueller Stand

<http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/publik.pdf>; S. 1

MANAFI, M. (2005)

Lebensmittel- und Betriebshygiene

<http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/LMhygiene.pdf>; S. 7

ÖSTERREICHISCHES REFERENZZENTRUM FÜR EHEC (2007)

am Department für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin

Leiter: Univ.-Prof. Dr. R. Würzner

Jahresbericht für das Jahr 2007

Homepage: <http://www2.i-med.ac.at/reflabs/>

http://www.bmgfj.gv.at/cms/site/attachments/3/5/9/CH0951/CMS1214392137719/ehec_jb_2007.pdf

ROBERT KOCH INSTITUT (1999)

Fallbericht: Inkomplettes HUS bei EHEC-Enteritis, übertragen durch Minipferde

Epidem. Bull. Nr. 37/1999, S. 276

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2001)

Ratgeber Infektionskrankheiten – 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

Erstveröffentlichung: Epidem. Bull. Nr. 31/1999

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2003)

Ausgewählte bakterielle Gastroenteritiden im Jahr 2002

Epidem. Bull. Nr. 46/2003, S. 374

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2003)

Ein HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende EHEC

des Serovars O157:H–: Untersuchungsergebnisse und Lehren für die Surveillance

Epidem. Bull., Nr. 22/2003, S. 171-175

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2006a)

Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen

Epidem. Bull. Nr. 41, Okt. 2006, S. 353-355

Datenstand: 1. März 2008

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2007)

Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2008a)

Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten, Stand 11.01.2008

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2008b)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007-

Jahresstatistik meldepflichtiger Krankheiten nach Bundesland, Deutschland, 2006 und 2007

Datenstand: 1. März 2008

www.RKI.de

ROBERT KOCH INSTITUT (2008c)

Übermittelte EHEC/STEC-Fälle pro 100.000 Einwohner nach Erreger, Deutschland, 2007 u. 2008

Fälle entsprechend der Referenzdefinition des RKI

SurvStat: <http://www3.RKI.de/SurvStat>

Datenstand: 26.11.2008)

ROBERT KOCH INSTITUT (2008d)

Erkrankungen durch enteropathische *Escherichia coli* (EHEC)

Epidem. Bull. Nr. 2, Januar 2008, S. 12

Datenstand: 11.Jan.2008

www.RKI.de

ZIMMERHACKL, L. B.; GERBER, A.; PEDIWILLA, P.; SCHEIRING, J.; MARTINI, S.; ORTH, D.; PETZLBERGER, B.; OBERAIGNER, W.; WÜRZNER, R.; KARCH, H. (2007)

Epidemiologie des EHEC assoziierten HUS

Epidemiology of EHEC associated Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS)

Tagungsband II. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11.Mai, S. 22

www.hus-online.at

www.haemolytic-uraemic-syndrome.org

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. h. c. Stolle für die bereitwillige Übernahme der Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Frau PD Dr. Barbara Schalch, danke ich für ihre engagierte Unterstützung und ihre prompten, konstruktiven und überaus wertvollen Korrekturen, ebenso wie für ihre unzähligen hilfreichen Tipps.

Herrn Dr. Stegen danke ich für die Überlassung des Themas sowie der Räumlichkeiten und Ausstattung des KHL, was das Anfertigen dieser externen Arbeit überhaupt erst ermöglichte. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich für seine Geduld und seine ermutigenden Ratschläge bedanken.

Mein spezieller Dank gilt Frau Dr. Janine Frech, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir in jeder Beziehung während der ganzen Zeit den Rücken stärkte. Vielen Dank auch den Mitarbeitern des KHL, insbesondere Frau Tanja Hofhansl für die Unterstützung im Labor.

Ich danke Patrick Kok für seine unentbehrliche Hilfe bei der Statistik, sowie Herrn Dr. Slaghuis von der Firma Merck für die bereitwillige Beantwortung der Fragen zu den Schnelltests.

Nicht zu vergessen sind meine Arbeitgeber aus der Tierklinik am Sandpfad, Dr. Leo Walla, Dr. Michael Deinert, Dr. Stefan Gaida, Annette Perk, Dirk Siemers und alle übrigen Kollegen, bei denen ich mich vielmals für ihr Verständnis und ihre Geduld bedanken möchte. Besonderen Dank schulde ich Dr. Stefan Gaida, der jede Dienstplanänderung zum Zwecke der Fertigstellung dieser Promotion mit viel Engagement möglich gemacht hat.

Ich danke allen, die mir nahestehen, für ihre Unterstützung. Meinen Freunden in diesem Zusammenhang vor allem dafür, dass sie immer zum richtigen Zeitpunkt aufbauende, ermutigende Worte gefunden haben. Danke insbesondere auch Dennis Esken und Uli Thanisch für ihre Hilfe bei sämtlichen computertechnischen Fragestellungen und sonstigen kleinen und großen Problemen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allen Dingen meinen Eltern, deren Unterstützung und Förderung mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

