Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Zum Vorkommen von Shiga Toxin 1-Varianten beim Rind in Südbayern

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

von
Franz Xaver Mayrshofer
aus Donauwörth

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. W. Klee

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung 1

2 Schrifttum 2

2.1 *E. coli* Pathovare 2

2.2 Shigatoxinogene *E. coli* (STEC) 2

2.2.1 Definition 2

2.2.2 Nomenklatur 2

2.3 STEC beim Menschen 3

2.3.1 Erkrankung beim Menschen 3

2.3.2 Vorkommen und Epidemiologie beim Menschen 3

2.4 STEC beim Rind 4

2.4.1 Vorkommen und Epidemiologie beim Rind 4

2.4.2 Verlauf beim Rind 6

2.5 Eigenschaften und Virulenzfaktoren der STEC 7

2.5.1 Allgemein 7

2.5.2 Varianten der Stx-Subtypen 8

2.5.2.1 Stx2-Varianten 8

2.5.2.2 Stx1-Varianten 8

2.6 Vorkommen von Stx1-Varianten 10

3 Eigene Untersuchungen 12

3.1 Material 12

3.1.1 Referenzstämme 12

3.1.2 Kulturelle Verfahren 12

3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) 13

3.1.4 Koloniehybridisierung 14

3.1.5 Sonstige Materialien und Geräte 14

3.2 Methoden 15

3.2.1 Untersuchungszeitraum und -gebiet 15

3.2.2 Nachweis von *stx*-Genen in Kotproben 16

3.2.2.1 Probennahme 16

3.2.2.2 Inokulation von Kotproben mit STEC 16

3.2.2.3 Anreicherung 17

3.2.2.4 DNA-Extraktion 17

3.2.2.5 PCR-Nachweise für *stx*-Gene 18

3.2.2.5.1 Screening Untersuchungen ... 18
3.2.2.5.2 Feindifferenzierung der *stx*-Gene ... 18
3.2.2.5.3 Bestätigung der Ergebnisse (real-time PCR) ... 23
3.2.3 Isolierung der STEC ... 25
3.2.3.1 Picken von Einzelkolonien ... 25
3.2.3.2 Kolonieblothybridisierung ... 25
3.2.4 Konservierung der Einzelkolonien ... 28
3.2.5 Charakterisierung der STEC-Isolate ... 28
4 Ergebnisse ... 30
4.1 Überprüfung der Handschuhe und Kotröhrchen zur Probenentnahme ... 30
4.2 Nachweisgrenze im künstlich kontaminierten Rinderfäzes ... 30
4.3 Ergebnisse der Screeninguntersuchungen ... 30
4.4 Vorkommen von *stx1*-Varianten ... 31
4.5 Ergebnisse der real-time PCR ... 35
4.6 Kolonieblotergebnisse ... 36
4.7 Charakterisierung der Isolate ... 36
5 Diskussion ... 39
6 Zusammenfassung ... 45
7 Summary ... 46
8 Literaturverzeichnis ... 47
9 Abkürzungsverzeichnis ... 57
10 Anhang ... 60
Danksagung ... 65
Lebenslauf ... 66

1 Einleitung

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), eine Untergruppe der Shigatoxin-produzierenden *E. coli*, zählen in Mitteleuropa zu den gefährlichsten bakteriellen Enteritiserregern, da sie neben hämorrhagischer Colitis lebensbedrohliche Komplikationen in Form des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) oder der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) verursachen können (Griffin und Tauxe, 1991).

Rinder stellen eines der wichtigsten Reservoire für Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC) dar (Beutin et al., 1993). STEC werden von den in der Regel klinisch unauffälligen Rindern mit dem Kot ausgeschieden und können somit bei unzureichender Hygiene in die menschliche Nahrung gelangen (Armstrong et al., 1996; Blanco et al., 2001). Auch eine Übertragung durch direkten Kontakt ist möglich.

Bislang wurde angenommen, dass Shigatoxin 1 (Stx1) im Gegensatz zu Stx 2, von dem zahlreiche Varianten existieren, relativ homogen ist. In neueren Untersuchungen wurden jedoch neben dem Prototyp aus Phage 933J (Jackson et al., 1987) mehrere Stx1-Varianten gefunden, die wesentlich vom Prototyp abweichen. Dies sind zum einen Stx1OX3 (Paton et al., 1995) bzw. Stx1c (Zhang et al., 2002a) und zum andern das von der Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch erstbeschriebene Stx1d (Bürk et al., 2003) bzw. Stx1v52 (Ohmura-Hoshino et al., 2003). Bisher liegen kaum epidemiologische Daten zur Verbreitung von Stx1-Varianten beim Rind vor.

Um das Vorkommen von Stx1-Varianten beim Rind zu klären, wurden über den Zeitraum von einem Jahr in sieben bayerischen Landkreisen Kotproben von klinisch unauffälligen Rindern auf *stx*-Gene untersucht und gezielt die *stx1*-Gene subtypisiert.

2 Schrifttum

2.1 *E. coli* Pathovare

Escherichia coli kommt als Teil der physiologischen Darmflora bei Mensch und Tier vor. Neben diesen apathogenen, physiologischen *E. coli* existieren jedoch auch so genannte *E. coli*-Pathovare. Diese verfügen über verschiedene Virulenzfaktoren, die durch horizontalen Gentransfer an andere Stämme weitergegeben werden können (Paton und Paton, 1998). Die darmpathogenen *E. coli* können in sechs Gruppen eingeteilt werden, deren Eigenschaften in einer Übersichtsarbeit von Kaper et al. (2004) dargestellt sind. Die größte Bedeutung kommt dabei in Industrieländern der Gruppe der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) zu, einer Untergruppe der shigatoxinogenen *E. coli*.

2.2 Shigatoxinogene *E. coli* (STEC)

2.2.1 Definition

Wenn ein *E. coli* die Fähigkeit zur Bildung von Shigatoxinen hat, wird er als shigatoxinogener *E. coli* (STEC) bezeichnet. Shigatoxine sind die wichtigsten Virulenzfaktoren der EHEC. Welche zusätzlichen Virulenzfaktoren (z.B. Intimin, EHEC-Hämolysin) erforderlich sind, damit ein STEC Erkrankungen beim Menschen auslösen kann, ist nicht restlos geklärt.

Ein STEC wird dann als EHEC bezeichnet, wenn er bei einem Patienten mit typischen klinischen Symptomen nachgewiesen wurde. In der Routinediagnostik ist es schwierig, diese Definition aufrechtzuerhalten. Deswegen sollte jeder STEC als potentieller EHEC-Erreger eingestuft werden (Azavedo et al., 1994; Bockemühl und Karch, 1996; RKI, 1999).

2.2.2 Nomenklatur

Auf Grund der von O´Brien und LaVeck (1983) beschriebenen immunologischen Verwandtschaft einiger *E. coli*-Toxine mit dem von *Shigella dysenteriae* Typ1 gebildeten Shigatoxin wurden diese Exotoxine als Shiga-like-toxine (SLT) bezeichnet (Jackson, 1990).

In der aktuellen Nomenklatur wird der Begriff Shigatoxin (Stx) unabhängig davon verwendet, ob das Toxin von *Shigella dysenteriae* oder *E. coli* gebildet wird. Daneben werden synonym für Shigatoxin die Begriffe **S**higa-**l**ike-**t**oxin (SLT), **S**higa**t**oxin (ST) und **V**erocyto**t**oxin bzw. **V**ero**t**oxin (VT) eingesetzt. STEC werden entsprechend auch als VTEC oder SLTEC bezeichnet.

2.3 STEC beim Menschen

2.3.1 Erkrankung beim Menschen

EHEC-Infektionen des Menschen führen zu akuten lokalen entzündlichen Prozessen des Dickdarms (Gastroenteritis), die sich über eine hämorrhagische Colitis (HC) zu den lebensbedrohlichen postinfektiösen Syndromen, dem hämolytisch urämischen Syndrom (HUS) und der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) weiterentwickeln können. Die dramatischen Krankheitsbilder lassen sich meist bei Säuglingen, Kleinkindern, alten Menschen, Schwangeren und Immunsupprimierten beobachten.

Die Krankheit beginnt ein bis drei Tage nach der Infektion mit wässriger Diarrhöe, die im Verlauf zunehmend blutig werden kann. Die Toxine gelangen auf hämatogenem oder lymphogenem Weg in den Blutkreislauf und rufen in den kleinen Gefäßen von Niere, Pankreas und Gehirn Endothelzellschäden hervor. Dies führt zu Gefäßverschlüssen und Gewebsnekrosen, somit zum Funktionsverlust der einzelnen Organe (Karmali et al., 1983; Wiss und Klare, 1987). Häufige Folge ist ein chronisches Nierenversagen mit Dialysepflicht.

2.3.2 Vorkommen und Epidemiologie beim Menschen

Der Mensch infiziert sich mit den weltweit verbreiteten STEC hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel oder durch Kontakt zwischen Menschen bzw. Tier und Mensch (Schmierinfektionen). Einer der größten EHEC-Ausbrüche trat 1996 in Japan auf, nachdem kontaminierte Rettichsprossen an Schulkantinen geliefert wurden. Von mehr als 8000 infizierten Personen erkrankten 106 Kinder an HUS. Für vier Kinder verlief die Erkrankung letal (Watanabe et al., 1996; Michino et al., 1998). 1996 starben in Schottland 20 von 500 erkrankten Personen nach dem Verzehr von Fleisch aus einer Metzgerei (Cowden und Cristie, 1997; Lidell, 1997; Ahmed und Donaghy, 1998). Durch Hamburger einer Fast-Food-Kette wurden in Amerika 700 Personen infiziert. Von den 55 HUS-Patienten starben vier Kinder (Bell et al., 1994).

Das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit hat über mehrere Jahre EHEC-Infektionen in Bayern ausgewertet. Im Zeitraum von April 1996 bis März 2003 wurden insgesamt 2439 EHEC-Infektionen in Bayern gemeldet. Von durchschnittlich ca. 350 registrierten Neuinfektionen jährlich, traten bei 68 % Krankheitsbeschwerden auf. Dies entspricht einer jährlichen Rate für symptomatische EHEC-Infektionen in der Allgemeinbevölkerung von 1,9 Infizierten pro 100.000 Einwohner. Die

Erkrankungshäufigkeit in der Altersgruppe der 0-4 Jährigen lag jährlich bei 24,0 pro 100.000 Einwohner. Es wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit gefunden. Die schwere Verlaufsform einer EHEC-Infektion, das HUS oder das inkomplette HUS (mindestens eines der klinischen HUS-Symptome), betraf 8,6 % aller gemeldeten symptomatischen EHEC-Infektionen (n = 143), d.h. durchschnittlich ca. 20 Fälle pro Jahr (Heißenhuber, 2004).

STEC sind wegen ihrer hohen Infektiösität und als mögliche Verursacher lebensbedrohlicher Erkrankungen von erheblicher gesundheitspolitischer Relevanz (Karch et al., 1996). Gemäß § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) besteht Meldepflicht für EHEC-Ausscheider und -Erkrankte. Unter anderem dürfen infizierte Personen, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen, ihre Tätigkeit nicht ausüben (§ 42 IfSG) und STEC-positive Schüler bzw. Lehrer nicht die Schule besuchen (§ 34 IfSG).

2.4 STEC beim Rind

2.4.1 Vorkommen und Epidemiologie beim Rind

Wiederkäuer, insbesondere Rinder, gelten als wichtigstes Reservoir für STEC. Die Angaben für die Prävalenz von STEC bei Rindern liegen in einer großen Bandbreite zwischen 12 % und 82 % (Tab. 1). Die Ursachen für diese sehr große Diskrepanz sind vielfältig. Neben fütterungs- und haltungsbedingten sowie geographischen Einflüssen kommt auch den verwendeten Untersuchungsmethoden eine wesentliche Bedeutung zu.

Bei einer Studie aus Australien wurde bei einer getreidebetonten Fütterung durch die Senkung des pH-Wertes im Darm ein höherer Anteil an *E. coli* und auch an STEC im Kot gefunden (McSweeney et al., 2004). Welche Raufutter geeignet sind, die STEC-Population im Darm zu verringern, muss erst in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Nach Fukushima und Seki (2004) ist die STEC-Ausscheidung jedoch nicht vom pH-Wert des Kotes abhängig. Diese Arbeitsgruppe hat dagegen im Juni und Juli einen deutlichen STEC-Ausscheidungspeak feststellen können. Das Untersuchungsverfahren, speziell die Screening-Methoden, stellen zusätzlich einen bedeutenden Faktor für die große Diskrepanz der Daten dar. Unterschiede in der Haltung und das Alter der Rinder sollen die Ausscheidung nicht signifikant beeinflussen (Rogerie et al., 2001).

Auf der Ebene der Herden ergibt sich eine ähnliche Situation. Grundsätzlich muß von einem hohen Anteil STEC-positiver Rinder- bzw. Schafherden ausgegangen werden, die Zahlen unterscheiden sich jedoch zwischen verschiedenen Untersuchungen erheblich (Tab. 1).

Über das Vorkommen von STEC der Serovar O157 beim Rind sind die Angaben sehr unterschiedlich. Sie reichen von 0,2 % bis 20 % (Čížek et al., 1999; Johnsen et al., 2001; Rogerie et al., 2001). Die meisten STEC in der BRD und Belgien gehören zu der Serovar O118 (Wieler et al., 1996; Pohl et al., 1997; Wieler et al., 1998).

Beim Rind überwiegt im Gegensatz zum Schaf und zur Ziege der *stx2*-Subtyp (Tab. 2). Mehrere Untersuchungen aus verschiedenen Ländern zeigen, dass beim Rind *stx1* alleine nicht mehr als bei einem Viertel der *stx*-positiven Proben vorkommt. In mehr als drei Viertel der Fälle tritt *stx2* allein oder in Verbindung mit *stx1* auf. STEC beim kleinen Wiederkäuer, wie Ziege und Schaf, tragen dagegen häufiger den *stx1*-Subtyp.

Tab. 1: Vorkommen von STEC in Rinderfäzes

Bezug	***stx*-positiv**	**Land**	**Referenz**
Rinder	29-82 %	BRD	Geue et al., 2002
Rinder	18 %	BRD	Zschöck et al., 2000
Rinder	64,6 %	Norwegen	Urdahl et al., 2003
Rinder	18,1 %	Frankreich	Rogerie et al., 2001
Rinder	71 %	Brasilien	Cerqueira et al., 1999
Rinder	12,5 %	Argentinien	Gioffré et al., 2002
Rinder	22,4 %	Polen	Osek et al., 2000
Rinder	37,2 %	Japan	Fukushima et al., 2004
Rinder	12,0 %	Japan	Otawa et al., 2004
Rinder	18 %	Indien	Khan et al., 2002
Kälber	12,7 %	Brasilien	Leomil et al., 2003
Kälber	19,4 %	Thailand	Panutdaporn et al., 2004
Kälber	15,9 %	Polen	Osek et al., 2001
Rinderherden	50 %	BRD	Zschöck et al., 2000
Rinderherden	92 %	Kanada	Renter et al., 2004
Rinderherden	30 %	Japan	Otawa et al., 2004
Schafe	32,1 %	BRD	Zschöck et al., 2000
Schafe	29,5 %	Spanien	Blanco et al., 2003
Schafe	36,2 %	Spanien	Rey et al., 2003
Schafherden	100 %	BRD	Zschöck et al., 2000

Tab. 2: Häufigkeit der s*tx*-Subtypen in Kotproben von Rindern und kleinen Wiederkäuern

Spezies	*stx1*	*stx2*	*stx1*+*stx2*	Land	Referenz
Rind	23 %	63 %	14 %	Frankreich	Rogerie et al.,2001
Rind	20 %	54 %	26 %	Spanien	Blanco et al., 2004
Rind	18 %	27 %	55 %	Japan	Fukushima et al., 2004
Rind	8,4 %	45,8 %	45,8 %	Thailand	Panutdaporn et al., 2004
Rind	11,5 %	45,8 %	42,7 %	BRD	Zschöck et al., 2000
Ziege	97,1 %	1,4 %	1,4 %		
Schaf	66,7 %	33,3 %	0 %		
Schaf	25 %	21,7 %	53,3 %	Schweiz	Zweifel et al., 2004
Schaf	55 %	3 %	42 %	Spanien	Blanco et al., 2004

2.4.2 Verlauf beim Rind

STEC-Infektionen verlaufen beim Rind meist inapperent. So wurden alle in Tabelle 1 aufgelisteten Ergebnisse bei klinisch unauffälligen Tieren diagnostiziert.

Im Blut und Kolostrum adulter Rinder wird häufig ein hoher Stx1-Antikörpergehalt gefunden (Borman-Eby et al., 1993; Pirro et al., 1995). Leomil et al. (2003) stellten bei Kälbern mit neonataler Kälberdiarrhöe einen signifikant höheren Anteil an STEC fest. Stx2 führt beim Rind meist nur zu einer schwachen Immunantwort mit geringer Antikörperbildung (Ashkenazi et al., 1988).

Die beim Rind krankheitsauslösenden STEC gehören meist zu den Serovaren O5, O8, O26, O103, O111, O118 und O153 (Chanter et al., 1984; Schoonderwoerd et al., 1988; Wieler et al., 1992).

2.5 Eigenschaften und Virulenzfaktoren der STEC

2.5.1 Allgemein

Die Pathogenität der STEC wird verursacht von mehreren Virulenzfaktoren. Der Hauptfaktor ist die Fähigkeit zur Produktion von Shigatoxinen (Stx), entweder eines oder beider Subtypen (Stx1, Stx2). Diese Toxine bestehen aus einer A- und fünf B-Untereinheiten (O'Brien und LaVeck, 1983; Donohue-Rolfe et al., 1984) und hemmen durch enzymatische Spaltung der 28s rRNA die Proteinbiosynthese der Zielzelle (Lingwood et al., 1987; Waddell et al., 1988). Funktionell bildet die A-Untereinheit die enzymatische bzw. toxische Komponente, die B-Untereinheiten sind für die spezifische Rezeptorbindung an Globotriaosyl (Gb3)-Rezeptoren verantwortlich. Die Toxine gelangen auf hämatogenem oder lymphogenem Weg in den Blutkreislauf und rufen in kleinen Gefäßen an Endothelzellen mit hoher Gb3-Rezeptordichte Schäden hervor (Wiss und Klare, 1987; Karmali, 1989).

Abgesehen von der Fähigkeit Shigatoxin zu produzieren, sind für die Pathogenität der STEC weitere Virulenzfaktoren von Bedeutung. Dem *eae*-Gen (**e**nterocyte **a**ttachment and **e**ffacement), von dem zur Zeit 15 genetische Varianten bekannt sind (Adu-Bobie et al., 1998; Oswald et al., 2000; Zhang et al., 2002b; Blanco et al., 2003; Blanco et al., 2004) und das neben den shigatoxinogenen *E. coli* auch die enteropathogenen *E. coli* (EPEC) besitzen, kommt hierbei mit die größte Bedeutung zu. Dieses Gen liegt auf dem Locus of Enterocyte Effacement (LEE), einer chromosomalen Pathogenitätsinsel, und codiert das Intimin, welches mit verantwortlich für die Anheftung der STEC an die Darmzellen ist. Auf der gleichen Pathogenitätsinsel befinden sich die Gene für Tir, einen translozierten Intimin-Rezeptor und die Serin-Proteasen espA, espB und espD. Weitere Virulenzfaktoren, über deren Funktion im Krankheitsgeschehen noch wenig bekannt ist, sind das plasmidcodierte EHEC-Hämolysin und die bei einigen Serotypen nachgewiesenen Adhäsine saa und iha (Tarr et al., 2000; Donnenberg und Whittham, 2001; Paton et al., 2001).

STEC, welche Erkrankungen beim Menschen verursachen können, gehören einer großen Anzahl verschiedener O:H Serotypen an. Besonders häufig wird der Serotyp O157:H7 mit schweren Erkrankungen beim Menschen in Zusammenhang gebracht. In den USA stellt dieser Serotyp noch immer zahlenmäßig den größten Anteil aller Isolate aus HUS-Patienten dar (Peacock et al., 2001). Dagegen spielen in Deutschland, wie auch in den meisten anderen europäischen Ländern, andere Serotypen ebenfalls eine große Rolle und übersteigen in ihrer Summe den klassischen EHEC-Serotyp O157:H7 deutlich (Gerber et al., 2002). Als typische EHEC-Serogruppen treten hierbei insbesondere O26, O103, O111, O118 und O145 in

Erscheinung (Misselwitz et al., 2003; Beutin et al., 2004). Insgesamt sind bis heute über 200 STEC-Serotypen bekannt, die Erkrankungen beim Menschen auslösen können (Blanco et al., o.J.; Bettelheim, 2003).

2.5.2 Varianten der Stx-Subtypen

2.5.2.1 Stx2-Varianten

Von *stx2* existieren einige Varianten, die sich in ihrer biologischen Aktivität zum Teil erheblich unterscheiden. Da die Nomenklatur der *stx2*-Varianten nicht einheitlich gehandhabt wurde, haben Scheutz et al. (2001) ein alpha-numerisches System zur Nomenklatur der verschiedenen *stx*-Varianten vorgeschlagen. S*tx2* und *stx2c*, das *stx2vh-a* und *stx2vh-b* einschließt, wird häufig in Verbindung mit HUS gebracht und somit als eines der *stx*-Gene, die mit einer hohen Virulenz des entsprechenden STEC in Verbindung stehen, eingestuft (Piérard et al., 1998). Stx2d, das hauptsächlich bei Isolaten vom Schaf auftritt (Ramachandran et al., 2001), ist für Menschen weniger toxisch (Piérard et al., 1998). Die Variante *stx2e* ist für Menschen nach derzeitigem Kenntnisstand nicht pathogen, weil das entsprechende Toxin sich nur an Gb4-Rezeptoren, die ausschließlich beim Schwein vorkommen, anlagert (Bülte, 1995). Dieses Toxin wurde als Auslöser der Ödemkrankheit des Ferkels identifiziert (Blanco et al., 1983; Weinstein et al., 1988). Des weiteren gibt es noch eine Tauben-spezifische *stx2*-Variante (*stx2f*).

2.5.2.2 Stx1-Varianten

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass *stx1* im Gegensatz zu *stx2* relativ homogen ist. Die bis dato wenigen *stx1*-Varianten (*stx1*[O48:H21]; *stx1*[O111:H-/CB168]; *stx1*[O111:H-/PH]) wiesen eine Homologie von 99 % mit dem Prototyp aus dem Phagen 933J auf (Abb. 1) (Paton et al., 1993). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass mindestens folgende drei *stx1*-Varianten existieren:

- ***stx1*-Prototyp** aus Phage 933J (Jackson et al., 1987)
- ***Stx1c*** bzw. ***stx1OX3***; mit einer Homologie von 97 % in der Aminosäuresequenz zu *stx1* (Paton et al., 1995; Zhang et al., 2002a).
- ***Stx1d*** bzw. ***stx1v52***; mit einer Homologie von 93 % in der Aminosäuresequenz zu *stx1* (Bürk et al., 2003; Ohmura-Hoshino et al., 2003).

Stx1OX3, später *stx1c* benannt, wurde erstmals in einem Isolat vom Schaf beschrieben (Paton et al., 1995), wogegen sowohl *stx1d* als auch die kurz darauf publizierte identische Variante *stx1v52* in Isolaten boviner Herkunft entdeckt wurden.

An 123 Stellen unterscheiden sich die Nukleinsäuren der drei Gene *stx1*, *stx1c* und *stx1d* (Bürk et al., 2003). Die Varianten *stx1c* und *stx1d* weisen an 28 Stellen dieselbe Abweichung gegenüber dem Prototyp auf (Abb. 4). An 12 Stellen stimmen die Nukleinsäuren von *stx1d* zwar mit *stx1* überein, aber nicht mit *stx1c*. In 83 Fällen unterscheidet sich *stx1d* von *stx1* und *stx1c*. Die phylogenetische Distanz der *stx*-Gene wird in Abbildung 1 als Dendrogramm verdeutlicht. Aus diesem ist auch ersichtlich, dass *stx1d* vermutlich nicht aus *stx1c*, sondern aus einer gemeinsamen Vorstufe beider Varianten entstanden ist.

Ohmura-Hoshino et al. (2003) beschrieben zusätzlich zu der Variante *stx1v52*, welche zu 100 % dem *stx1d* homolog ist, das Gen *stx1v51*. Da dieses sich in der Nukleinsäuresequenz nur in zwei Basenpaaren von *stx1v52* unterscheidet und eine 100 %ige Homologie der Aminosäuren aufweist, wurde diese Variante in der vorliegenden Arbeit nicht näher berücksichtigt. Nach Klonierung und Aufreinigung des Stx1v52-Toxins konnte die oben genannte Arbeitsgruppe die Zytotoxität dieser Variante genauer untersuchen. *In vitro* war die enzymatische Inhibition der Proteinbiosynthese annähernd gleich dem Toxin des Prototyps. Die biologische Aktivität von Stx1v52, im Zytotoxitätstest mit Verozellen und im Mäuse-Letalitätstest, war dagegen deutlich geringer als die von Stx1.

Das *stx*-Gen von *Shigella dysenteriae* Typ 1, welches eine große Ähnlichkeit zu dem *stx1*-Gen von *E. coli* aufweist, wurde 1988 zum ersten mal mit Bakteriophagen in Verbindung gebracht (Strockbine et al., 1988). Für *stx1* und *stx1c* konnte nachgewiesen werden, dass die Gene in das Genom von lysogenen λ-ähnlichen Phagen integriert sind (Jackson et al., 1987; Koch et al., 2001). Der *stx1c*-tragende Phage 6220 zeigte dabei morphologisch und genotypisch eine große Ähnlichkeit mit dem Phagen 933W, der aus einem EHEC O157 isoliert wurde und *stx2* codiert, während er stark von dem *stx1*-tragenden Phagen H-19B abwich (Neely und Friedman, 1998; Plunkett et al., 1999; Koch et al., 2001). Von *stx1d* ist bislang nicht bekannt, ob das Gen ebenfalls auf einem Phagengenom liegt. Die Lokalisation der *stx*-Gene auf Phagen führt dazu, dass die genetische Information leicht auf andere Stämme übertragen werden kann, aber auch durch Subkultivierung verloren gehen kann.

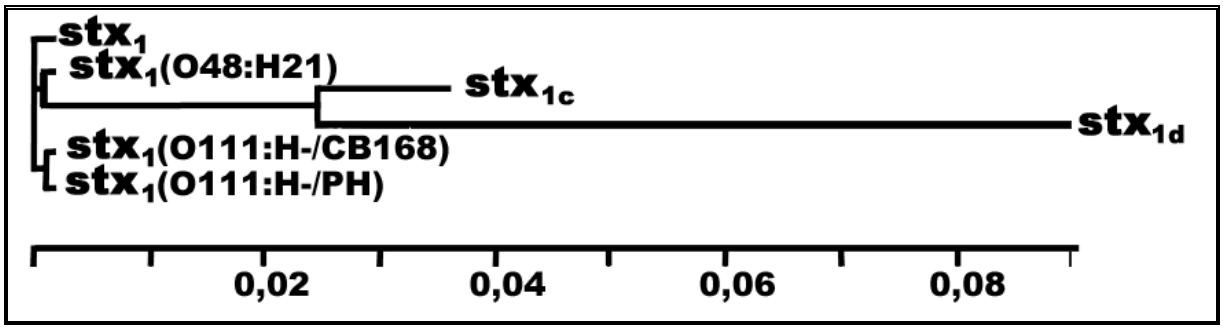


Abb. 1: Phylogenetische Distanz zwischen den *stx1*-Genen (Bürk et al., 2003)

2.6 Vorkommen von Stx1-Varianten

Mehrere Studien aus verschiedenen europäischen Ländern belegen, dass *stx1c* bei Schafen weit verbreitet ist (Tab. 3). Außer bei einer Untersuchung überwog *stx1c* dabei das klassische *stx1* mit 66 - 83 % der *stx1*-postitiven Isolate deutlich (Koch et al., 2001; Urdahl et al., 2002; Brett et al., 2003). Zweifel et al. (2004) geben dagegen einen ebenfalls hohen Anteil von 42,6 % *stx1c* an der Gesamtzahl der *stx1*-positiven Isolate an. Zu berücksichtigen ist, dass bei einigen Untersuchungen methodisch bedingt nicht differenziert werden konnte, ob *stx1c* in einer Probe allein vorlag oder in Kombination mit *stx1*.

Die 136 *stx1c*-positiven Isolate vom Schaf in der Studie von Brett et al. (2003) verteilen sich auf 41 verschiedene Serotypen, wobei jedoch 52 % der Isolate auf die häufig beim Schaf gefundenen Serotypen O5:H$^-$, O128:H2 und O123:H$^-$ entfielen. Das *eae*-Gen wurde nur in wenigen *stx1c*-positiven Isolaten nachgewiesen, wogegen das *saa*-Gen häufig mit *stx1c* assoziiert zu sein scheint (Brett et al., 2003, Friedrich et al., 2003).

Stx1c wurde beim Rind bisher nur in einer Studie nachgewiesen. Brett et al. (2003) fanden in 5,8 % von 104 *stx1*-positiven bovinen Isolaten *stx1c*. In zwei weiteren Untersuchungen konnte *stx1c* dagegen in Proben vom Rind (27 Isolate bzw. 79 Kotproben) nicht nachgewiesen werden (Koch et al., 2001, Urdahl et al., 2003). Über die Prävalenz von *stx1d* bei Rindern oder anderen Tierarten liegen noch keine Daten vor.

Bislang gibt es nur wenige epidemiologische Daten über das Vorkommen von Stx1-Varianten bei STEC-Isolaten vom Mensch. Koch et al. (2001) stellten fest, dass 30,6 % von 72 vom Mensch stammenden s*tx1*-positiven Isolaten die Variante *stx1c* tragen (Tab. 3). Zhang et al. (2002a) kamen bei 212 untersuchten Isolaten auf einen niedrigeren Wert von 17,0 %, wobei bei keinem der *stx1c*-positiven Isolate das *eae*-Gen nachgewiesen werden konnte und keines zu den fünf wichtigsten EHEC-Serogruppen (O157, O26, O103, O111, O145) zählte. Von den infizierten Personen waren 19 asymptomatisch, 16 hatten leichte Diarrhöe und ein Patient

entwickelte HUS, wobei bei dessen Isolat *stx1c* zusammen mit *stx2* auftrat. Auch Friedrich et al. (2003) konnten bei keinem vom Menschen isolierten *stx1c*-positiven STEC das *eae*-Gen nachweisen. In einer australischen Studie enthielten von 45 *stx1*-Isolaten 13 *stx1c* (28,9 %), davon war ein Isolat *eae*- und *stx2*-positiv (Brett et al., 2003).

An der Universitätsklinik in Münster wurden 206 vom Menschen isolierte *stx1*-positive STEC mit einer real-time PCR feindifferenziert (Kuczius et al., 2004). Von diesen wiesen 170 den *stx1*-Prototyp, 34 *stx1c*, eine *stx1d* und eine eine noch nicht näher bestimmte *stx1*-Variante auf (Tab. 3).

Tab. 3: Anteil von *stx1*-Varianten an s*tx1*-positiven Isolaten

Spezies	***stx1***	***stx1c***	***stx1d***	***stx1+stx1c***	**Land**	**Referenz**
Rind	100 %	0%			BRD	Koch et al., 2001
Schaf	20,8 %	79,2 %				
Mensch	69,4 %	30,6 %				
Mensch	83,0 %	17,0 %			BRD	Zhang et al., 2002a
Mensch	74,3 %	25,7 %		0 %	BRD	Friedrich et al., 2003
Mensch	82,5 %	16,5 %	0,5 %		BRD	Kuczius et al., 2004
Rind	93,3 %	5,8 %		0,9 %	Australien	Brett et al., 2003
Schaf	25,1 %	65,7 %		9,2 %		
Mensch	71,1 %	28,9 %		0 %		
Schaf	57,4 %	42,6 %		0 %	Schweiz	Zweifel et al., 2004
Schaf	17,0 %	83,0 %			Norwegen	Urdahl et al., 2002
Rind	100 %	0 %				

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Referenzstämme

Tab. 4: Referenzstämme

Stammbezeichnung	***stx*-Typ**	**Quelle**
E. coli C 600 J1	*stx1*	Bundesamt für Risikobewertung (BfR), Dessau
E. coli C 600 W34	*stx2*	BfR, Dessau
ATCC43895	*stx1; stx2*	American Type Culture Collection
6592/02	*stx1c*	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
MHI813	*stx1d*	Bürk et al., 2003

3.1.2 Kulturelle Verfahren

Geräte:

Schüttler [Bender&Hobein, Vortex Genie 2™]

Inkubationsschüttler [GFL, 1083]

Waage [Sartorius, L2200P]

Heizplatte [IKAMAG® RET]

Reagenzien:

Modifizierte Trypton-Soja-Bouillon (mTSB):

30 g/l Tryptone soya broth [Oxoid, Art.-Nr. CM129]

1,5 g/l Bile Salts NO.3 [Oxoid, Art.-Nr. L56]

1,5 g/l Potassium Phosphate [Sigma, Art.-Nr. P-8281]

Novobiocin [Sigma N-1628]

Standard I-Agar [Merck, Art.-Nr. 1.07881.0500]

Standard II-Agar [Merck, Art.-Nr. 1.07883.0500]

Sorbitol-McConkey-Agar [Oxoid, Art.-Nr. CM813]

Columbia-Agar mit Schafblut Plus [Oxoid, Art.-Nr. PB5039A]

Hirn-Herz-Bouillon [Merck, Art.-Nr. 1.10493.0500]

BBL™ Enterotube™ II [BD, Art.-Nr. 273176]

Identification Sticks Oxidase [Oxoid, Art.-Nr. BR0064A]

Natronlauge 1 mol/l [Roth, Art.-Nr. K021.1]

Duopath® Verotoxin GLISA [Merck, Art.-Nr. 1.04144.]

Glycerin 87 % [Merck, Art.-Nr. 104094]

3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Geräte:

Zentrifuge [Biofuge pico, Heraeus]

Heizblock [Thermomixer Eppendorf]

Thermocycler [Thermo Electron Corporation]

Spannungsgeber [Pharmacia Biotech]

Elektrophoresekammern [Biometra]

Geldokumentation Video 8-Entry [Biostep, Jahnsdorf]

LightCycler 2.0 [Roche]

LC-Zentrifuge [Roche]

Reagenzien:

Thermoprime Plus DNA Polymerase [ABgene®, Art.-Nr. AB-0301/B]

dNTP Set (Hochkonz.) (100 µmol/dNTP) [ABgene®, Art.-Nr. AB-0315]

LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes [Roche, Art.-Nr. 3003 248]

Midi ABgarose [ABgene®, Art.-Nr. AG-0300/B]

peqGOLD DNA-Sizer XIII, 72-1.353 bp [PEQLAB, Art.-Nr. 25-2170]

100 bp-Leiter 0,1-1 kbp äquimolar [Diagonal; Art.-Nr. P805]

Gel Loading Solution [Sigma, Art.-Nr. G2526-5ML]

Ethidiumbromidlösung 1 % [Serva, Art.-Nr. 21251]

Tris-Acetat-Puffer 0,04 mol/l, pH 8,2 mit Zusatz von 1 mmol/l EDTA

Verbrauchsmaterial:

LightCycler capillaries (20 µl) [Roche, Art.-Nr. 1909339]

Safe-Look Tubes 1,5 ml [Eppendorf AG, Art.-Nr. 0030 120.086]

Safe Guard Filterspitzen 0,5-10 µl Eppendorf [PEQLAB, Art.-Nr. 81-1011]

Safe Guard Filterspitzen 1-100 µl Universal [PEQLAB, Art.-Nr. 81-1030]

Safe Guard Filterspitzen 100-1000 µl Universal [PEQLAB, Art.-Nr. 81-1050]

0,2 ml Thermo-Tubes [ABgene®, Art.-Nr. AB 0337]

Alle Primer (Tab. 7 und 8) wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg in Auftragssynthese hergestellt.

Sonden für die real-time PCR (HybProbes® für LightCycler, Tab. 8) wurden über TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin bezogen.

3.1.4 Koloniehybridisierung

Geräte:

Hybridisierungsofen mit Thermoschüttler [UVP, HB-1000 Hybridizer]

Crosslinker [UVP, CL-1000]

Reagenzien:

DIG Easy Hyb [Roche, Art.-Nr. 1603558]

Dig Wash and Block Buffer Set [Roche, Art.-Nr. 1585762]

Blocking Reagent [Roche, Art.-Nr. 1096176]

Anti Digoxigenin-AP [Roche, Art.-Nr. 1093274]

NBT/BCIP ready-to-use tablets [Roche, Art.-Nr. 1697471]

PCR DIG Probe Synthesis Kit [Roche, Art.-Nr. 1636090]

DNA-Längenstandard VIII, Digoxigenin-markiert [Roche, Art.-Nr. 1449451]

Dodecylsulfat, Natriumsalz [Serva, Art.-Nr. 20765]

Trizma® Base [Sigma; Art.-Nr. T-1503]

Natriumchlorid [RdH, Art.-Nr. 31434]

Kaliumhydroxid-Plätzchen [Fluka, Art.-Nr. 60370]

Maleinsäure [Roth, Art.-Nr. 3538.1]

Magnesiumchlorid [Merck, Art.-Nr. 105832]

EDTA [Sigma, Art.-Nr. E 1644]

Salzsäure 5 mol/l [Merck, Art-Nr. 1.09911.0001]

Triton X-100 [Sigma, Art.-Nr. X 100 RS]

Eisessig [Merck, Art.-Nr. 100063]

Hilfsmittel:

Hybridisierungsflaschen [A. Hartenstein, Art.-Nr. HF 15]

Glasspatel, Pinzette, sterile Wattestäbchen, Petrischalen

Laborschale aus Melamin [Roth, Art.-Nr. 8455]

Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization [Roche, Art.-Nr. 1699075]

Gel-Blotting-Papier, Whatmann 3 MM Papier [Roth, Art.-Nr. 49281]

3.1.5 Sonstige Materialien und Geräte

CryoTube™ 4,5 ml [Nunc, Art.-Nr. 363452]

Pipetten [Eppendorf Research]

Untersuchungshandschuhe 90 cm [C. Vogel KG, Stuttgart]

Stuhlgefäß [Greiner Bio-One GmbH, Art-Nr. 443102]

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchungszeitraum und -gebiet

Die Untersuchungen erstreckten sich von August 2003 bis September 2004. In diesem Zeitraum wurden 247 klinisch unauffällige Kühe bzw. Kalbinnen aus 38 Betrieben beprobt. Die Proben stammten aus südbayerischen Betrieben mit Anbindehaltung, Laufstall oder Weidehaltung (Tab. 5, Abb. 2). Dabei wurden ca. 15-20 % der Kühe pro Bestand untersucht.

Tab. 5: Probenherkunft

Landkreis	Betriebe*	Haltung		
		Angebunden*	Laufstall*	Weide*
Dachau (DAH)	3 (20)	2 (10)	1 (10)	
Dillingen a. d. Donau (DLG)	8 (51)	4 (18)	4 (33)	
Donau-Ries (DON)	19 (97)	14 (58)	4 (36)	1 (3)
Erding (ED)	1 (10)		1 (10)	
Fürstenfeldbruck (FFB)	2 (15)	1 (5)	1 (10)	
München (M)	1 (16)		1 (16)	
Bad Tölz-Wolfratshausen (TÖL)	2 (20)	1 (10)	1 (10)	
Weilheim-Schongau (WM)	2 (18)	1 (8)	1 (10)	
Gesamt	**38 (247)**	**23 (109)**	**14 (135)**	**1 (3)**

***:** in Klammer: Zahl der Proben

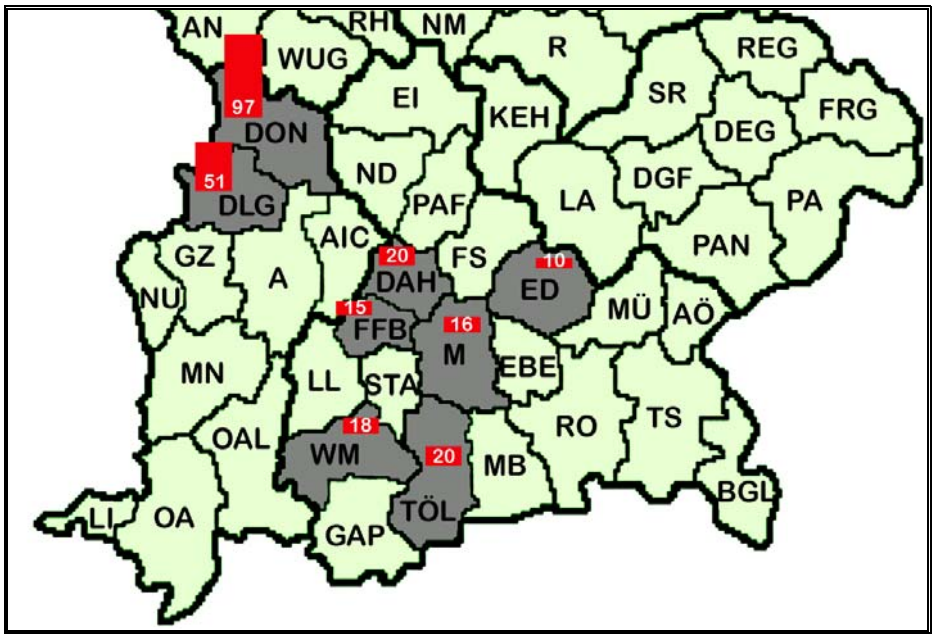


Abb. 2: Untersuchungsgebiet (grau markiert: beprobte Landkreise (Tab. 4); rot: Anzahl der entnommenen Proben)

3.2.2 Nachweis von *stx*-Genen in Kotproben

3.2.2.1 Probennahme

Die Proben wurden rektal mit handelsüblichen Untersuchungshandschuhen aus 100 % Polyethylen entnommen und bis zur Untersuchung in Stuhlröhrchen maximal 48 h gekühlt aufbewahrt.

Es wurden drei Untersuchungshandschuhe und drei Stuhlröhrchen pro Packung auf STEC untersucht. Je ein Stuhlröhrchen bzw. Handschuh wurde in 225 ml mTSB + Novobiocin im Schüttelwasserbad bei 37 °C für 16 bis 20 h inkubiert.

Mit der Anreicherungsbouillon wurden hierauf nach einer DNA-Extraktion dieselben Screeninguntersuchungen durchgeführt, wie sie in Abschnitt 3.2.2.5 beschrieben sind.

3.2.2.2 Inokulation von Kotproben mit STEC

Um die Sensitivität der Screening-PCR zu überprüfen, wurde jeweils 1 g einer Rinderfäzesprobe mit einem der drei Referenzstämme, C 600 J1 (Stx1), C 600 W34 (Stx2) und 815 (Stx1+Stx2) inokuliert. Die Kontamination wurde mit drei verschiedenen Keimkonzentrationen (1-10, 10-100, 100-1000 KbE/g) durchgeführt.

Anschließend wurden die neun Proben mittels PCR mit den Primern MK1/MK2, wie unten beschrieben, untersucht. Zum Ausschluss einer natürlichen STEC-Kontamination wurde die native Rinderfäzesprobe ebenso untersucht.

Der Untersuchungsgang wird in den folgenden Teilabschnitten näher erläutert. Eine Übersicht über den Untersuchungsablauf gibt Abb. 3.

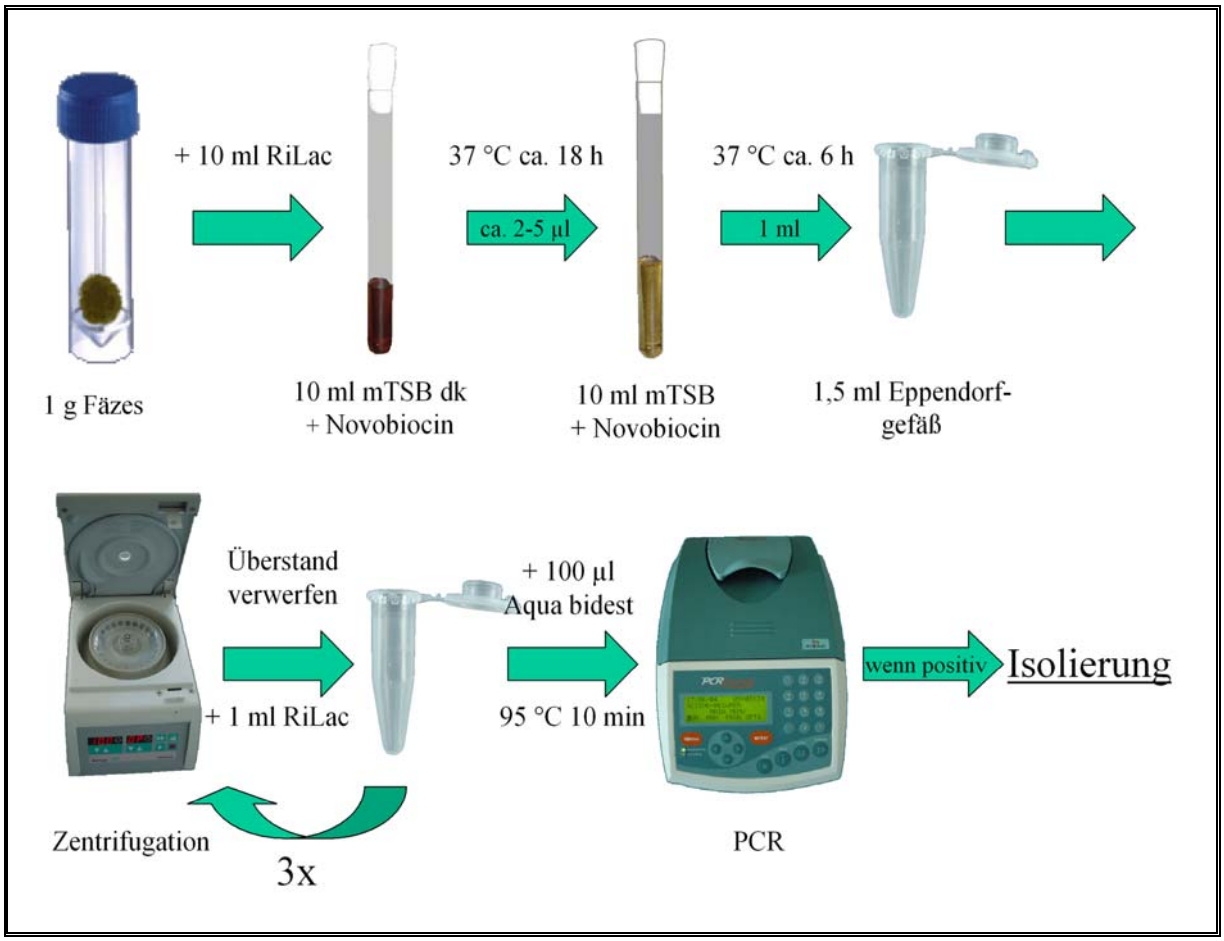


Abb. 3: Untersuchungsgang (RiLac: Ringer-Lacton-Lösung; dk: doppelt konzentriert; mTSB: modifizierte Trypton-Soja-Bouillon)

3.2.2.3 Anreicherung

In die mit ca. 1 g Kot gefüllten Stuhlröhrchen wurden 10 ml Ringer-Lacton-Lösung gegeben und mittels Vortex aufgeschüttelt. Diese Suspension wurde in ein Reagenzröhrchen zu 10 ml doppelt konzentrierter modifizierter Trypton-Soja-Bouillon (mTSB) mit Novobiocinzusatz (20 mg/ml) gegeben und für ca. 18 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Von dieser Anreicherung wurden 2-5 µl in 10 ml einfach konzentrierter mTSB-Lösung mit Novobiocinzusatz für ca. 6 h bei 37 °C inkubiert.

Für die DNA-Extraktion wurde 1 ml dieser Unteranreicherung verwendet. Der Rest wurde bei 4 °C aufbewahrt, um daraus im Falle eines positiven Ergebnisses den STEC zu isolieren.

3.2.2.4 DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion wurde 1 ml der Unteranreicherung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und fünf Minuten bei 5500 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 1 ml Ringer-Lacton-Lösung resuspendiert und wiederum fünf Minuten bei 5500 x g zentrifugiert. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Waschschrittes wurde das Pellet in

100 µl Aqua bidest aufgenommen und zur Freisetzung der DNA durch Zellruptur zehn Minuten bei 100 °C inkubiert. Diese Lösung wurde für die PCR-Untersuchungen verwendet. Für spätere Untersuchungen wurden die Extrakte bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2.5 PCR-Nachweise für *stx*-Gene

Alle PCR-Untersuchungen wurden mit einem Gesamtvolumen von 50 µl und einer Probenmenge von 2 µl DNA-Extrakt durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermix für jedes Primerpaar ist in Tabelle 6 aufgeführt, die Reaktionsbedinungen in Tabelle 7.
Die entstandenen Amplikons wurden auf einem zweiprozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, in Ethidiumbromidlösung (0,05 %) angefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

3.2.2.5.1 Screening Untersuchungen

Für das Screening auf *stx*-Gene wurden bei allen Proben Untersuchungen mit den Primerpaaren MK1/MK2 (Karch u. Mayer, 1989) und Lin3/Lin5 (Lin et al., 1993) durchgeführt. Diese Primerpaare erfassen sowohl *stx1* als auch *stx2* einschließlich der meisten Varianten dieser Gene. Die genauen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6 und 7 aufgeführt.
Da die Screening-Primer MK1/MK2 und Lin3/Lin5 *stx1d* nur ungenügend erfassen, wurden alle Proben zusätzlich mit dem Primerpaar VT1AvarF/VT1AvarR (Bürk et al., 2003) untersucht (Tab. 6 und 7).

3.2.2.5.2 Feindifferenzierung der *stx*-Gene

Alle Proben, die bei einer der Screening-Untersuchungen oder mit dem Primerpaar VT1AvarF/VT1AvarR ein positives Ergebnis aufwiesen, wurden in mehreren PCR-Untersuchungen mit varianten- bzw. subtypspezifischen Primern feindifferenziert. Dabei fanden die in Tabelle 7 aufgeführten Primerpaare Verwendung. In der Abbildung 4 sind die Annealing-Positionen der Primer in den Sequenzen von *stx1*, *stx1c* und *stx1d* dargestellt.
Zuerst wurde mit den Primerpaaren LP30/LP31 (spezifisch für *stx1*) bzw. LP43/LP44 (spezifisch für *stx2*) (Cebula et al., 1995) festgestellt, welcher *stx*-Subtyp vorlag. Bei Proben, die nur *stx2* aufwiesen, wurde keine weitere Feindifferenzierung auf *stx2*-Varianten durchgeführt.

Bei den *stx1*-positiven Proben wurde untersucht, ob es sich um *stx1, stx1c*, *stx1d* oder eine Kombination mehrerer Varianten handelt. Für die Untersuchung auf *stx1c* fanden die Primerpaare stx1c-1/stx1c-2 (Zhang et al., 2002a) und Lin5/1OX3 (Koch et al., 2001) Verwendung (Tab. 7). Die Untersuchungen auf das Vorhandensein von *stx1d* fanden, wie bei den Screeninguntersuchungen (Abschnitt 3.2.2.5.1) beschrieben, statt.

Bei allen Untersuchungen wurden eine Negativkontrolle (Aqua bidest) und eine Positivkontrolle (DNA-Extrakte der entsprechenden Referenzstämme) mitgeführt.

Tab. 6: Zusammensetzung des Mastermix für die verwendeten PCR-Nachweise (48 µl Mastermix, 2 µl DNA-Extrakt je PCR-Ansatz)

Primerpaar	**10x-PCR-Puffer**	**MgCl (25 mM)**	**dNTP (200 nM)**	**Primer (10 µM)**	**Poly-merase (5 U/µl)**	**Aqua bidest**
Lin3/Lin5; KS7/KS8; stx1c-1/stx1c-2; Lin5/1OX3; hlyA1/hlyA4; VT1AF/VT1AR/VT1BR2; VT1BR/VT1BR2;	5 µl	5 µl	1 µl	je 2,5 µl	0,5 µl	31,5 µl
LP30/LP31; LP43/LP44; SK1/SK2	5 µl	5 µl	1 µl	je 2,5 µl	0,2 µl	31,8 µl
MK1/MK2	5 µl	6 µl	1 µl	je 2,5 µl	1,25 µl	29,75 µl
VT1AvarF/VT1AvarR	5 µl	5 µl	1 µl	je 2,5 µl	0,25 µl	31,75 µl

Tab. 7: Oligonucleotidprimer mit PCR-Bedingungen

Primer-paar	Sequenzen	Gen(e)	PCR-Bedingungen			Produkt-größe (bp)	Referenzen
			Denaturierung	Annealing	Extension		
MK1 MK2	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	*stx1+stx2*	94 °C, 60 s	44 °C, 60 s	72 °C, 90 s	230	Karch u. Mayer 1989
Lin3 Lin5	TTT GAT TGT TAC AGT CAT GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT	*stx1+stx2*	94 °C, 60 s	43 °C, 90 s	72 °C, 90 s	887	Lin et al. 1993
LP30 LP31	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG	*stx1*	94 °C, 90 s	64 °C, 90 s	72 °C, 90 s	348	Cebula et al., 1995
KS7 KS8	CCCGGATCCATGAAAAAAACATTATTAATAGC CCCGAATTCAGCTATTCTGAGTCAACG	*stx1*	94 °C, 30 s	52 °C, 60 s	72 °C,40 s	282	Schmidt et al., 1994
LP43 LP44	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	*stx2*	94 °C, 90 s	64 °C, 90 s	72 °C, 90 s	584	Cebula et al., 1995
VT1varF VT1varR	CTT TTC AGT TAA TGC GAT TGC T AAC CCC ATG ATA TCG ACT GC	*stx1d*	94 °C, 60 s	5 x 62 °C, 60 s 5 x 58 °C, 60 s 20 x 54 °C, 60 s	72 °C, 60 s	192	Bürk et al., 2003
Lin5 1OX3	GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT CTC ATT AGG TAC AAT TCT	*stx1c*	94 °C, 60 s	48,1 °C, 90 s	72 °C, 90 s	555	Koch et al., 2001
stx1c-1 stx1c-2	TTT TCA CAT GTT ACC TTT CCT CAT AGA AGG AAA CTC ATT AGG	*stx1c*	94 °C, 30 s	51 °C,60 s	72 °C,60 s	498	Zhang et al., 2002
SK1 SK2	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	*eae*	94 °C, 30 s	52 °C, 60 s	72 °C, 90 s	863	Schmidt et al., 1994
hlyA1 hlyA4	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A	*hly*	94 °C, 30 s	57 °C, 60 s	72 °C, 90 s	1550	Schmidt et al., 1995
VT1AF VT1AR VT1BR2	TCG TAT GGT GCT CAA GGA GT AGT TCT GCG CAT CAG AAT TG AGA ACC GGC AAC AAC TGA CT	*stx1*	94 °C, 60 s	52 °C, 60 s	72 °C, 60 s	966 1309	Bürk et al., 2003
VT1BF VT1BR	CGC CTG ATT GTG TAA CTG GA TGA ATC CCC CTC CAT TAT GA	*stx1*	94 °C, 60 s	52 °C, 60 s	72 °C, 60 s	189	Bürk et al., 2003

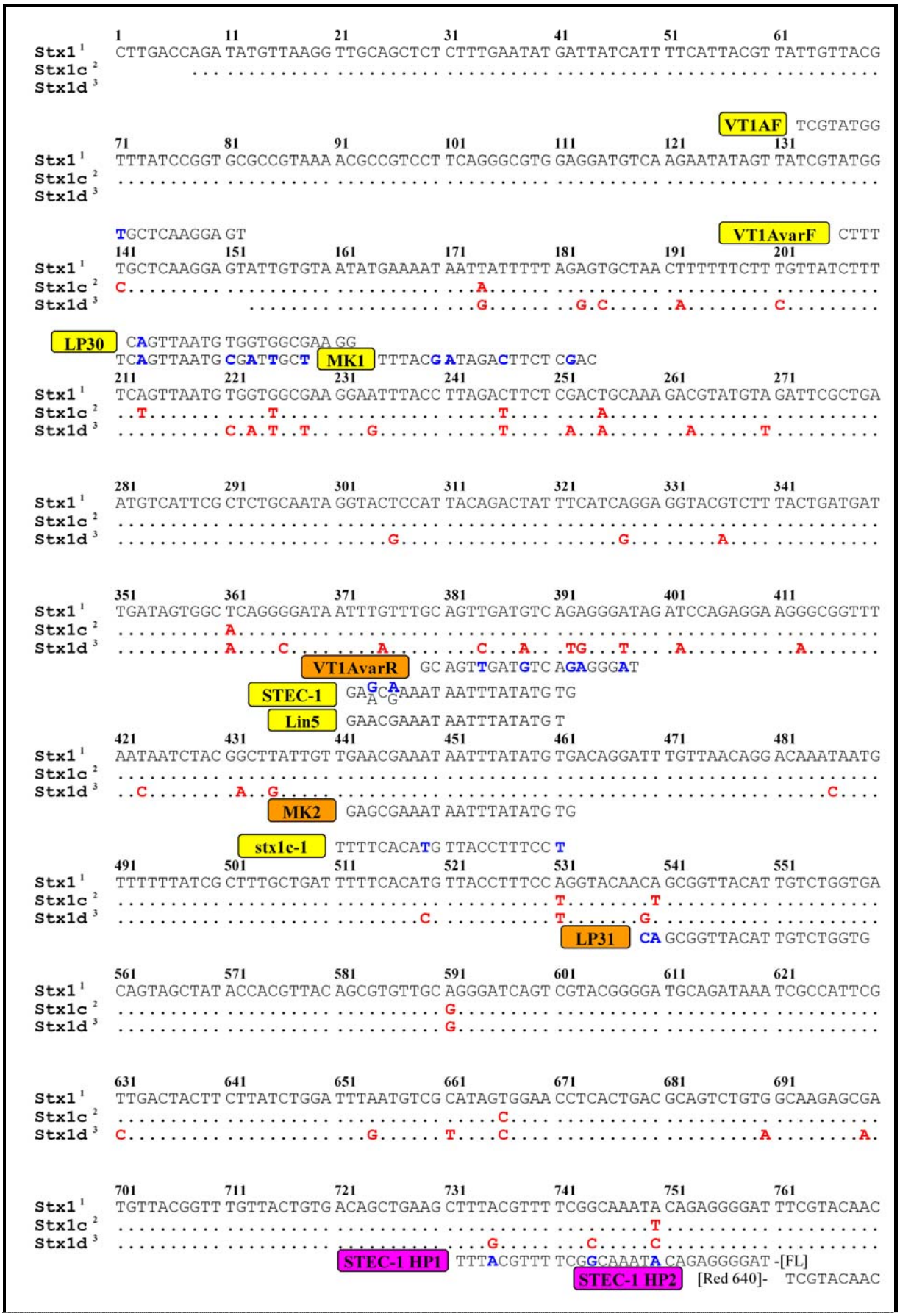


Abb. 4: Positionen der verwendeten Primer in den Gensequenzen von *stx1* (NCBI:M19473), *stx1c* (NCBI:Z36901) und *stx1d* (NCBI:AY170851)

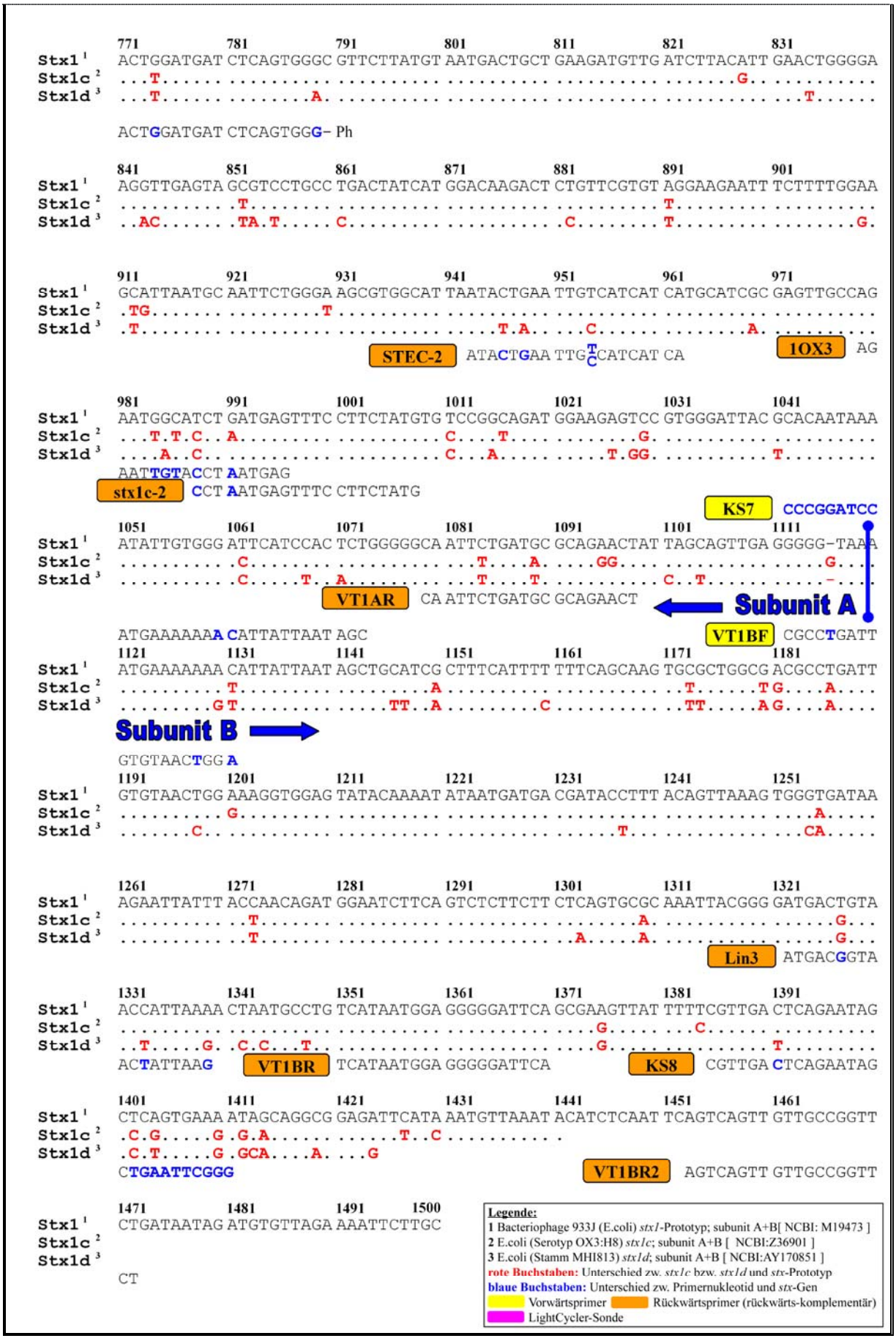


Abb. 4: Fortsetzung

3.2.2.5.3 Bestätigung der Ergebnisse (real-time PCR)

Zur Bestätigung der Ergebnisse mit klassischer PCR wurden alle *stx*-positiven Proben mit einer real-time PCR unter Verwendung von Hybridisierungssonden (Reischel et al., 2002) auf dem LightCycler 2.0 Gerät untersucht (Tab. 8).

Dabei wird aus einem *stx*-Gen mit dem Primerpaar STEC-1/STEC-2, das sowohl *stx1* als auch *stx2* einschließlich Varianten erfasst, ein ca. 520 bp großes Nukleotidstück vervielfältigt. Mit diesem hybridisieren beim Vorliegen von *stx1* die Sonden STEC-I HP-1 und STEC-I HP2 bzw. beim Vorliegen von *stx2* die Sonden STEC-II HP-1 und STEC-II HP-2. Die Sonden STEC-I HP-1 und STEC-II HP-1 sind am 3´-Ende mit Fluoreszein markiert, die Sonden STEC-I HP-2 und STEC-II HP-2 tragen am 5´-Ende den Farbstoff Red 640 (LC Red 640-N-hydroxy-succinimide ester) bzw. Red 705 (LC Red 705-phosphoramidite). Wenn die Sonden korrekt mit dem Amplikon für *stx1* bzw. *stx2* hybridisiert haben, liegen zwischen den beiden Sonden nur ein bzw. zwei Nukleotide. Durch die räumliche Nähe der Sonden entsteht bei Anregung des Fluoreszeins ein Energietransfer vom FRET-Typ (Fluorescence Resonance Energy Transfer) auf die Farbstoffe Red 640 bzw. Red 705 und Fluoreszenz in deren Wellenlängenbereich wird messbar (Abb. 5).

Bei einer real-time PCR unter Verwendung von Hybridisierungssonden kann die Temperaturstabilität der Bindung zwischen den Amplifikaten und den Sonden mit Hilfe einer Schmelzkurve analysiert werden. Dabei wird am Ende des PCR-Laufes die Temperatur schrittweise von 50 °C bis 95 °C um 0,2 °C erhöht und dabei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Je stabiler die Bindung der Sonden an das Amplikon ist, desto höher ist die Schmelztemperatur, d.h. desto länger kann eine Fluoreszenz im Emissionsbereich der Nachweissonden gemessen werden. In der Schmelzkurve zeigt der Wendepunkt, bei welcher Temperatur sich die meisten Bindungen lösen. Diese Temperatur ist abhängig von der Nukleotidsequenz der Sonde, insbesondere dem GC-Gehalt, aber auch von Fehlpaarungen beim Vorliegen von Mutanten. Die verwendeten Sonden wurden von Reischl et al. (2002) so gelegt, dass anhand der Schmelzkurven *stx1* und *stx1c* bzw. *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* und *stx2f* differenziert werden können. Vorversuche zeigten, dass auch *stx1d* deutlich von *stx1* und *stx1c* differenziert werden kann.

Die LightCycler-PCR wurde mit Hilfe des LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes-Kit der Firma Roche durchgeführt. Dabei wurde pro PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl folgender Zusammensetzung gearbeitet:

- 2 µl DNA-Extrakt
- 4 µl 5 x konzentrierter Mastermix

- je 1 µl (10 µM) der Primer STEC-1 und STEC-2
- je 1 µl (4 µM) der Sonden STEC-I HP1, STEC-I HP2, STEC-II HP1, STEC-II HP2
- 8 µl Aqua bidest

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Initiale Denaturierung: 95 °C, 10 min
- Amplifikation: 50 Zyklen
  - Denaturierung: 95 °C, 10 s
  - Annealing: 50 °C, 20 s
    Fluoreszenzmessung
  - Elongation: 72 °C, 30 s
- Schmelzkurve: 50 – 95 °C; 0,2 °C/s
  Fluoreszenzmessung kontinuierlich

Tab. 8: Primer und Sonden für die real-time PCR (Reischl et al., 2002)

Oligo-nukleotide	Sequenzen	Gen(e)	Nukleotid Position*
Primer:			
STEC-1	5'-GA(AG) C(AG)A AAT AAT TTA TAT GTG-3'	*stx1+stx2*	442-462
STEC-2	5'-TGA TGA TG(AG) CAA TTC AGT AT-3'	*stx1+stx2*	943-962
Sonden:			
STEC-I HP-1	5'-TTT ACG TTT TCG GCA AAT ACA GAG GGG AT-[FL]	*stx1*	732-760
STEC-I HP-2	[Red 640]-TCG TAC AAC ACT GGA TGA TCT CAG TGG G-Ph	*stx1*	762-788
STEC-II HP-1	TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC TGT GTA-[FL]	*stx2*	778-807
STEC-II HP-2	[Red 705]-ACC ATG ACG GGA GAC GTG GAC CT-Ph	*stx2*	809-834

*: Position in *stx1* (NCBI:M19473)

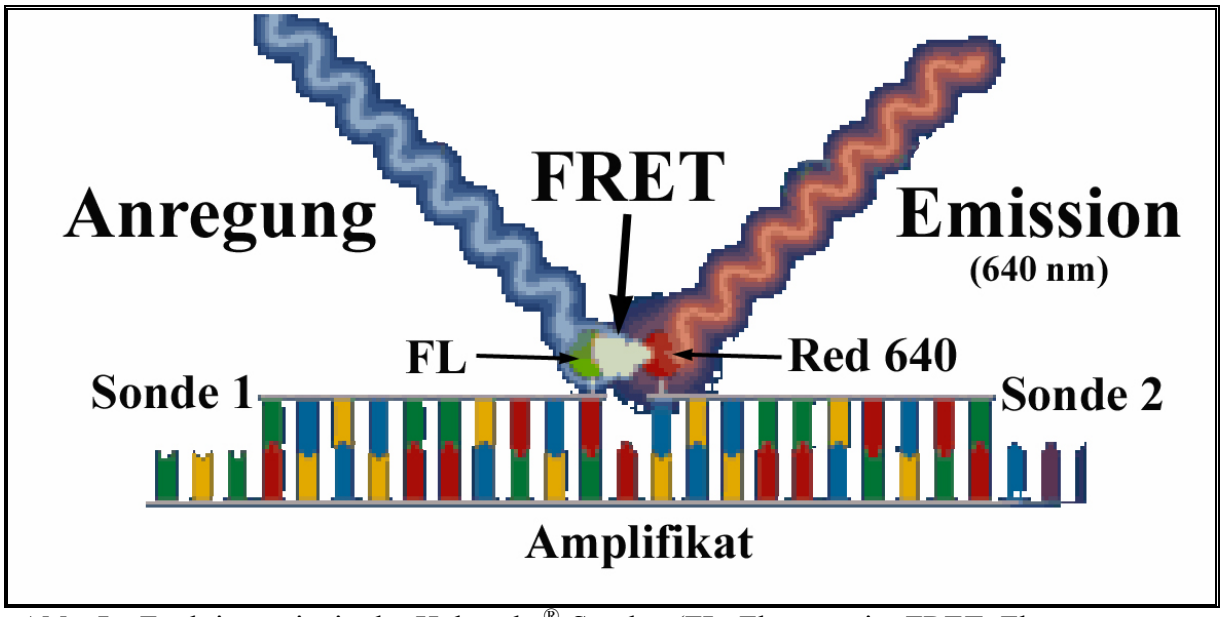


Abb. 5: Funktionsprinzip der Hybprobe®-Sonden (FL: Floureszein; FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer; Red 640: LightCycler Red 640 Farbstoff);
Quelle: Roche, modifiziert

3.2.3 Isolierung der STEC

3.2.3.1 Picken von Einzelkolonien

Bei hohen STEC-Konzentrationen ist es möglich, ein Aliquot der Unteranreicherung auf Nähragar auszuspateln und durch das Picken von mehreren Einzelkolonien den oder die STEC zu isolieren. Dazu wurden die positiven Proben auf Sorbitol McConkey (SMAC)-Agar subkultiviert. Von dieser Platte wurden mindestens fünf Kolonien abgenommen und jeweils in 100 µl Ringer-Lacton in einem sterilen Eppendorfgefäß suspendiert. Von diesen 100 µl wurden 50 µl zur PCR-Analyse wie unter 3.2.2.5.1 und 3.2.2.5.2 beschrieben verwendet. Die restlichen 50 µl wurden bei 4 °C gelagert, um bei einem positiven PCR-Ergebnis daraus den STEC zu kultivieren.

3.2.3.2 Kolonieblothybridisierung

Bei einem niedrigen Anteil von STEC an der Gesamtzahl der *E. coli* ist das Picken von Einzelkolonien wenig erfolgreich und stattdessen ein Kolonieblot das Mittel der Wahl. Bei der Kolonieblothybridisierung werden auf einer Membrane die shigatoxinogenen Keime mit einer digoxigenin-markierten Oligonukleotid-Sonde hybridisiert. Positive Kolonien können dann von der Masterplatte abgenommen und subkultiviert werden.

Die digoxigenin-markierten Sonden für *stx1* und *stx2* wurden mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit der Firma Roche hergestellt. So wurde in einer PCR mit den Primern

MK1/MK2 (Tab. 7) in das Amplifikat der Referenzstämme C600 J1 (*stx1*) und C600 W34 (*stx2*) digoxigenin-markiertes Desoxyuridin-Triphosphat (Dig-dUTP) anstatt dTTP eingebaut (Abb. 6). Nach Ausschneiden und Aufreinigen der Banden aus einem Agarosegel wurden die Sonden gespottet, um die für eine Hybridisierung optimale Konzentration der Sonde zu ermitteln.

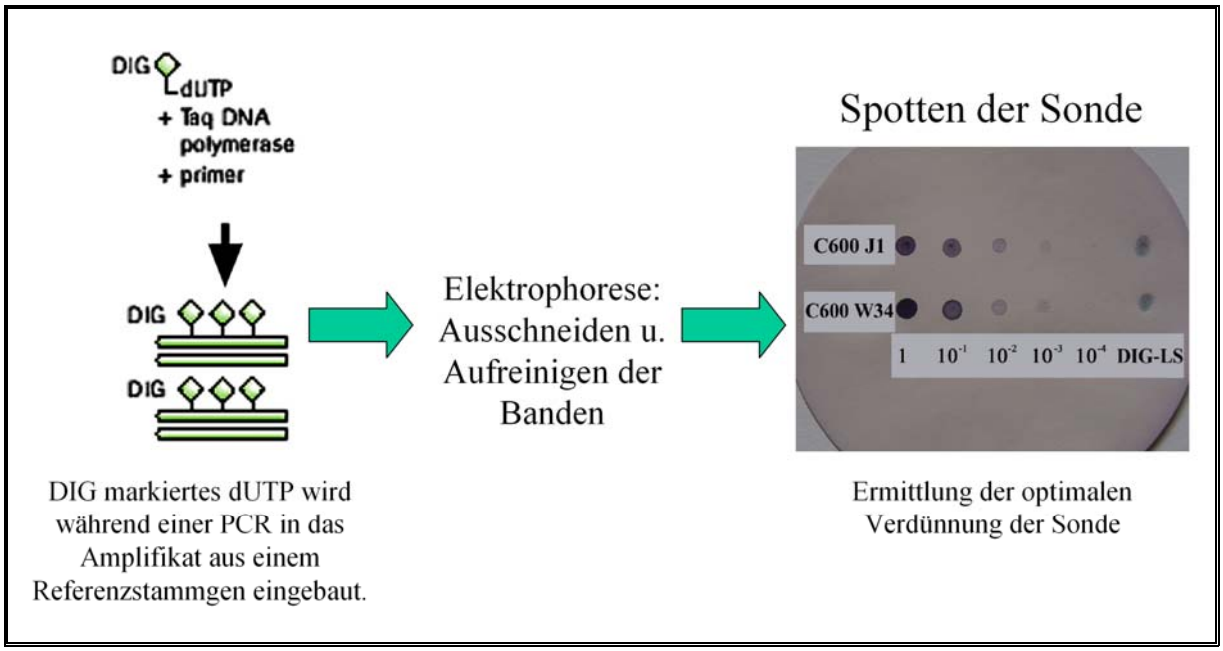


Abb. 6: Sondenherstellung (DIG: Digoxigenin; dUTP: Desoxyuridin-Triphosphat; C600 J1: Referenzstamm *stx1*; C600 W34: Referenzstamm *stx2*; DIG-LS: Digoxigenin Standard

Der Ablauf des Kolonieblots und das Prinzip der anschließenden immunologischen Reaktion sind in der Abbildung 7 verdeutlicht.

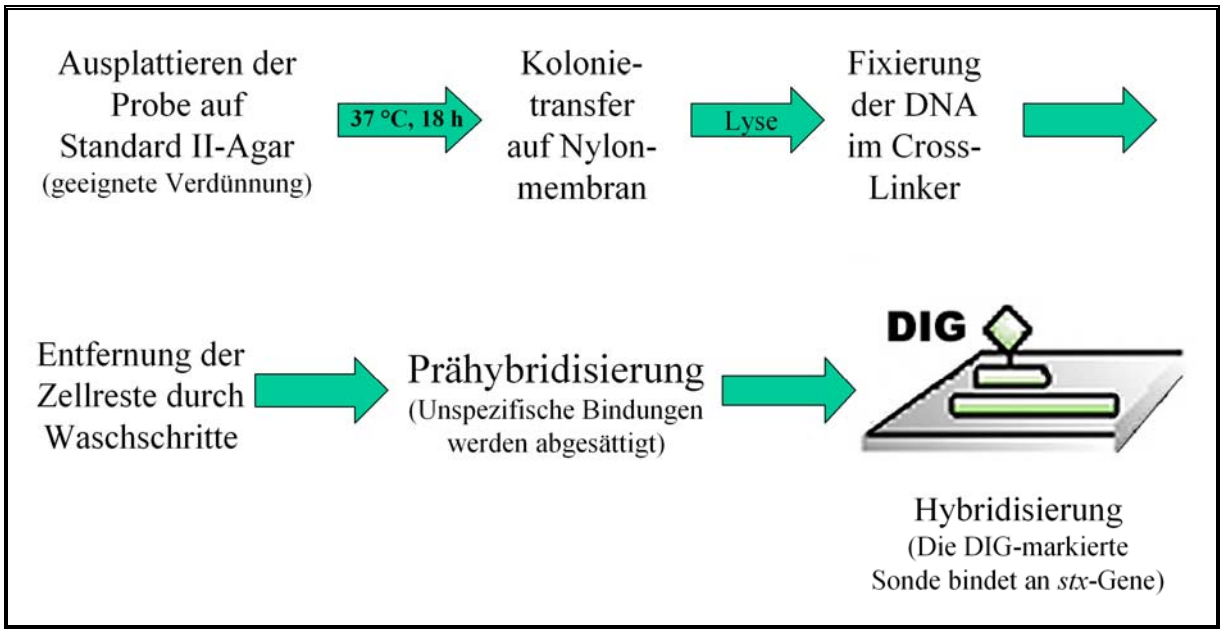


Abb. 7: Kolonieblot

Nach Ausspateln einer dezimalen Verdünnungsreihe der entsprechenden Unteranreicherung auf Standard I-Agar und anschließender Inkubation bei 37 °C für ca. 18 Stunden wurde jeweils eine Platte mit ca. 100 - 300 gleichmäßig verteilten Kolonien ausgewählt. Auf diese Masterplatte wurde die Nylonmembran (Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization [Roche]) aufgelegt und deren Lage so markiert, dass nach dem Kolonieblot die positiven Kolonien auf der Membran eindeutig den Kolonien auf der Masterplatte zugeordnet werden konnten. Sobald die Membran überall durchfeuchtet war, wurde sie zügig abgezogen und an einer noch freien Stelle mit einer Kolonie eines Referenzstammes als Positivkontrolle versehen. Die Masterplatte wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Lyse der Bakterienzellwand wurde die Membran für 20 min auf ein mit Denaturierungslösung (0,5 mol/l NaOH, 1,5 mol/l NaCl) getränktes 3 MM Whatmann Papier gelegt, anschließend fünf Minuten getrocknet, dann auf ein mit 0,2 % Triton-X100, 0,5 mol/l NaOH getränktes 3 MM Whatmann Papier gelegt, wiederum getrocknet und nach einer fünfminütigen Inkubation auf einem mit Neutralisierungslösung (1 mol/l TRIS, 1,5 mol/l NaCl) getränkten 3 MM Whatmann Papier für fünf Minuten in 2 x SSC (0,3 mol/l NaCl, 0,03 mol/l TRIS) gewaschen. Die so freigewordene DNA wurde durch UV-Licht im Cross-Linker auf der Membran fixiert.

Die Zellreste wurden durch 20-minütiges Waschen in 2 x SSC, 1 % SDS bei 50 °C und anschließendes vorsichtiges Abstreifen der Membranen mit sterilen Wattetupfern entfernt. Danach wurden die Membranen noch zweimal 20 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS und zweimal in 2 x SSC gewaschen.

Damit unspezifische Bindungen abgesättigt und äquilibriert werden, d.h. ein pH-Wert geschaffen wird, bei dem die Sonden optimal binden können, wurden die Membranen in Glashybridisierungszylinder gegeben und mit 20 ml Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb) 60 min bei 48 °C im Hybridisierungsofen prähybridisiert.

In der folgenden Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung durch drei Milliliter Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, mit Zusatz von 25 ng/ml DIG-markierte Sonde) je Membran ersetzt und über Nacht bei 48 °C im Hybridisierungsofen inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal fünf Minuten in 0,5 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Hierauf folgten zwei spezifische Waschschritte, die Basenpaarungen mit weniger als 95 % Homologie zwischen der Hybridisierungssonde und der DNA auf der Membran verhindern, bei 60 °C in 0,5 x SSC, 0,1 % SDS.

Um nun die DIG-markierten Sonden auf der Membran sichtbar zu machen, wird ein farbgebender immunologischer Nachweis durchgeführt. Ein Anti-Digoxigenin-Antikörper,

der mit alkalischer Phosphatase (AP) markiert ist, bindet an die DIG-markierte Sonde. Die Waschschritte wurden mit den Reagenzien des Dig Wash and Block Buffer Set (Roche) durchgeführt. Um zu verhindern, dass die Antikörper unspezifisch binden, wurde die Membran nach einminütiger Inkubation im Waschpuffer für 30 min in der Blockierungslösung gewaschen. Hierauf wurde der Filter mit 20 ml des Antikörperkonjugats (4 µl Anti Digoxigenin-AP in 20 ml Maleinsäurepuffer [Dig Wash and Block Buffer Set]) für 30 min inkubiert und anschließend zweimal im Waschpuffer gewaschen. Nachdem die Membran für zwei Minuten im Detektionspuffer inkubiert worden war, wurde sie in einer Petrischale mit 10 ml Färbelösung (10 ml Aqua dest. + 1 Färbetablette [NBT/BCIP ready-to-use tablets]) im Dunklen inkubiert. Nach Sichtbarwerden der Positivkontrolle und der positiven Kolonien wurde die Färbereaktion durch Waschen der Membranen im TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA) abgestoppt.
Die auf dem Filter angefärbten Kolonien wurden auf der dazugehörigen Masterplatte identifiziert und auf einer Blutagarplatte subkultiviert.

3.2.4 Konservierung der Einzelkolonien

Alle *stx*-positiven Isolate wurden in Standard-I-Stichagar überimpft und nach einer Inkubation bei 37 °C über 18-24 h bei 4 °C luftdicht gelagert.
Zur längeren Konservierung wurde das Verfahren nach Primose und Wardlaw (1982) angewendet. Nach Anreicherung in Standard-I-Bouillon wurde Kulturmaterial in sterile Kryoröhrchen mit Glyzerin und Glasperlen überführt. Die Keime heften sich auf der Oberfläche der Glasperlen an und der Überstand kann abgegossen werden. Die Röhrchen wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Charakterisierung der STEC-Isolate

Alle Isolate wurden auf *stx*-Gene sowie die Gene für die Virulenzfaktoren Intimin und EHEC-Hämolysin untersucht:
Der s*tx*-Subtyp wurde mit den Primerpaaren LP30/LP31 bzw. LP43/LP44 bestimmt (Tab. 7). Die Variante *stx1c* wurde mit dem Primerpaar Lin5/stx1OX3 und *stx1d* mit VT1AvarF/VT1AvarR nachgewiesen.
Das Vorhandensein des *eae*-Gens bzw. des Gens für das EHEC-Hämolysin wurde mit den Primern SK1/SK2 (Schmidt et al., 1994) bzw. hylA1/hylA2 (Schmidt et al., 1995) überprüft.

Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6 und 7 enthalten. Kulturell wurde mittels BBL™ Enterotube™ II die Spezieszuordnung als *E. coli* überprüft.

Mit der Kombination der Primer VT1AF mit VT1BR (Bürk et al., 2003) lassen sich größere Abschnitte (1309 bp) der *stx1*-Gene amplifizieren (Tab. 7). Von sechs *stx1d*-positiven Proben wurde aus diesem PCR-Produkt in Auftragssequenzierung durch MWG, Ebersberg und LGL, Oberschleißheim die Nukleinsäuresequenz bestimmt.

Bei allen isolierten *stx1d*- und *stx1c*-Varianten wurde mit dem immunchromatischen Test Duopath® Verotoxin GLISA der Firma Merck untersucht (Park et al., 2003), ob die Shigatoxine exprimiert werden.

Zur Serotypisierung wurden die STEC an das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) Dessau versandt.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Handschuhe und Kotröhrchen zur Probenentnahme

Zur Probenziehung wurden drei Packungen Latexhandschuhe und fünf Packungen Stuhlröhrchen verbraucht. Es wurden insgesamt neun Handschuhe und 15 Stuhlröhrchen auf STEC untersucht. Von den 24 Untersuchungen war bei 17 Proben kein Keimwachstum in mTSB vorhanden. Bei den sieben Proben mit Keimwachstum konnten mittels PCR keine *stx*-Gene nachgewiesen werden.

4.2 Nachweisgrenze im künstlich kontaminierten Rinderfäzes

Im Rahmen eines Kontaminationsversuches wurde festgestellt, bis zu welcher Keimkonzentration STEC in künstlich kontaminierten Rinderfäzes mit der in dieser Arbeit verwendeten Screening-Methode nachweisbar sind. Bei einer Kontamination mit ca. 1000 oder ca. 100 KbE/g waren die anschließenden PCR-Untersuchungen positiv. Bei der Kontamination mit 10 KbE/g war für den Referenzstamm 600 W34 (*stx2*) ein *stx*-negatives Ergebnis zu verzeichnen. Bei den beiden anderen Referenzstämmen zeigte sich bei dieser Keimkonzentration dagegen ein positives Ergebnis.
In der nativen Kotprobe waren keine STEC nachweisbar.

4.3 Ergebnisse der Screeninguntersuchungen

Von den 247 Fäzesproben wiesen 96 bei beiden Screeningmethoden (Primer MK1/MK2 und Lin3/Lin5) nach der Elektrophorese unter dem UV-Licht eine deutliche Bande auf (Tab. 9). Von diesen 96 Proben ließen sich 89 in nachfolgenden Untersuchungen als *stx*-positiv bestätigen. Bei 38 Proben, von denen sich 28 als *stx*-positv bestätigen ließen, war die Screeninguntersuchung mit MK1/MK2 positiv, aber mit Lin3/Lin5 negativ. Ein positives Ergebnis mit den Lin3/Lin5-Primern und ein negatives Ergebnis mit MK1/MK2 war bei drei Proben aufgetreten. Von diesen ließen sich zwei als positiv bestätigen.
Mit dem Primerpaar VT1AvarF/VT1AvarR, das spezifisch *stx1d* nachweist, wurde bei 17 Proben ein positives Ergebnis verzeichnet. Bei 16 von diesen wurde in der Schmelzkurve der real-time PCR das Vorhandensein dieser Variante nachgewiesen (Tab. 9). Bei einer Probe entsprach die Schmelztemperatur nicht der des Referenzstammes für *stx1d*. Von den 17 *stx1d* positiven Proben waren sechs in der Screeninguntersuchung bei beiden Primerpaaren negativ und zwei nur mit dem MK-Primerpaar positiv.

Tab. 9: Ergebnisse der PCR-Screeninguntersuchung von 247 Rinderfäzesproben auf *stx*-Gene

Primer	Anzahl	bestätigt*
MK1/MK2 und Lin3/Lin5 positiv:	96	89
MK1/MK2 positiv und Lin3/Lin5 negativ:	38	28
Lin3/Lin5 positiv und MK1/MK2 negativ:	3	2
VT1AvarF/VT1AvarR positiv:	17	16

*: durch subtyp- bzw. variantenspezifische Primer oder durch real-time PCR (LightCycler)

Insgesamt betrachtet waren von den 247 Fäzesproben 120 (48,6 %) *stx*-negativ, 124 (50,2 %) *stx*-positiv und drei nicht eindeutig; d.h. es wurde in mehreren PCR-Untersuchungen ein schwach positives Ergebnis festgestellt, das aber nicht eindeutig mit der real-time PCR bestätigt werden konnte. Die 124 *stx*-positiven Proben verteilen sich auf 63 von 109 (57,8 %) Proben aus Anbindehaltung, auf 58 von 135 (43,0 %) Proben aus Laufstallhaltung und auf drei von drei (100 %) Proben aus Weidehaltung.

4.4 Vorkommen von *stx1*-Varianten

Bei 33 Proben (13,4 %) konnte nur *stx1*, bei 31 Proben (12,6 %) nur *stx2* und bei 60 Proben (24,3 %) konnten beide *stx*-Typen in Kombination nachgewiesen werden (Abb. 8). Von den 247 Proben enthielten 68 (27,5 %) den *stx1*-Prototyp, 16 (6,5 %) die Variante *stx1c* und 16 (6,5 %) *stx1d*. Einige Proben enthielten dabei Kombinationen verschiedener *stx1*-Varianten (Abb. 10 und 11).

Die Primerkombination stx1c-1/stx1c-2 (Zhang et al., 2002a) erwies sich für den spezifischen Nachweis von *stx1c* als ungeeignet, da sie auch *stx1d* erfasste. Auch durch graduelle Erhöhung der Annealingtemperatur konnte die Spezifität dieses Primerpaares nicht verbessert werden (Abb. 9). Die Kombination der Primer Lin5 und 1OX3 (Koch et al., 2001) hingegen erwies sich als *stx1c*-spezifisch. Mit dieser Primerpaarung wurden 16 Proben als *stx1c*-positiv gewertet. Diese zeigten auch in beiden Screeninguntersuchungen ein positives Ergebnis.

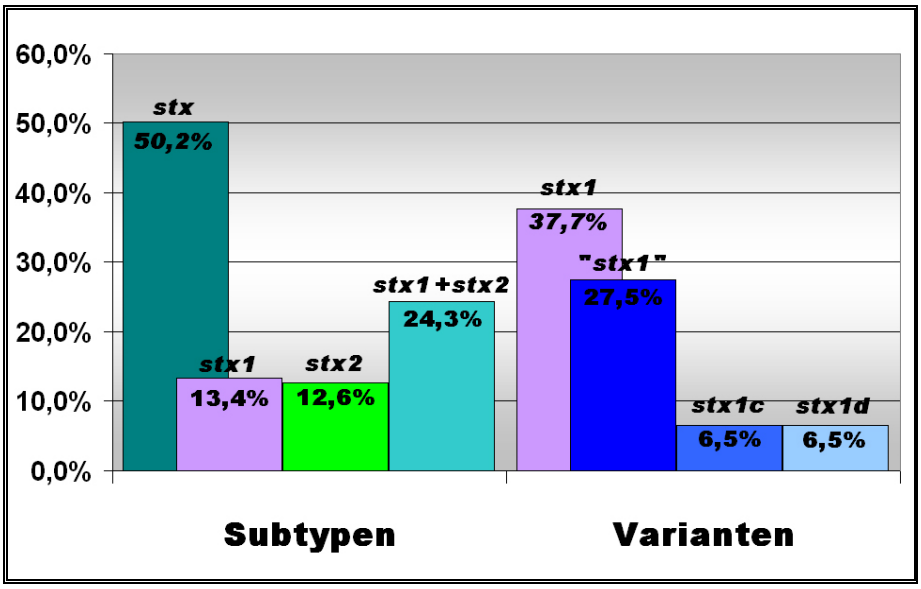


Abb. 8: Nachweishäufigkeit der beiden *stx*-Subtypen und der *stx1*-Varianten in 247 Fäzesproben vom Rind

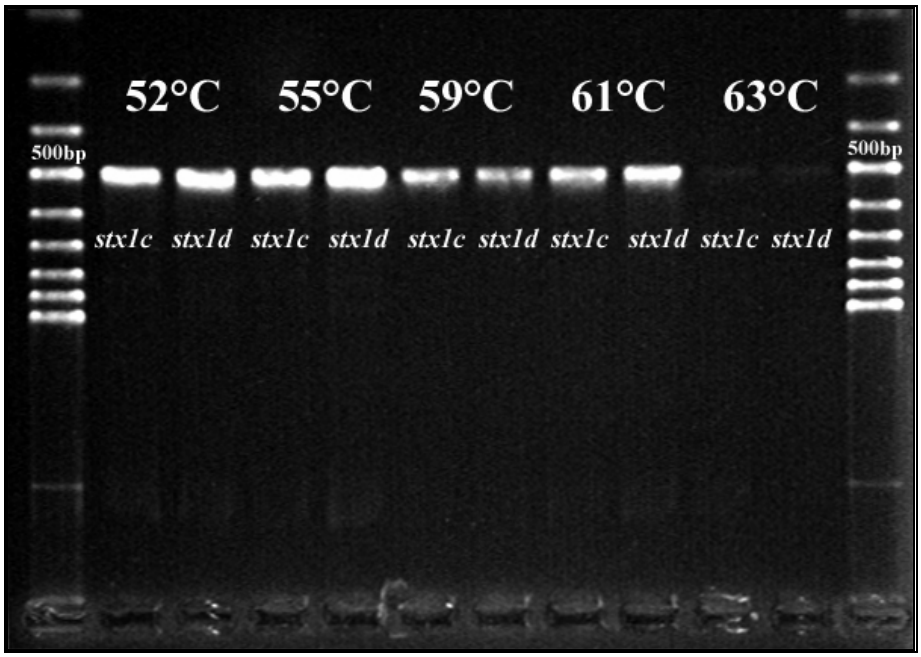


Abb. 9: Versuch zur Verbesserung der Spezifität des PCR-Nachweises von *stx1c* mit dem Primerpaar stx1c-1/stx1c-2 durch graduelle Erhöhung der Annealingtemperatur

Der Anteil der einzelnen *stx1*-Varianten im Bezug auf alle 93 *stx1*-Subtyp-positiven Proben ist in der Abbildung 10 dargestellt. Am häufigsten kam der *stx1*-Prototyp alleine vor. *Stx1c* bzw. *stx1d* traten elf bzw. 13 mal alleine und einmal in Kombination auf. Der *stx1*-Prototyp kombiniert mit *stx1c* wurde vier mal nachgewiesen, mit *stx1d* zwei mal.

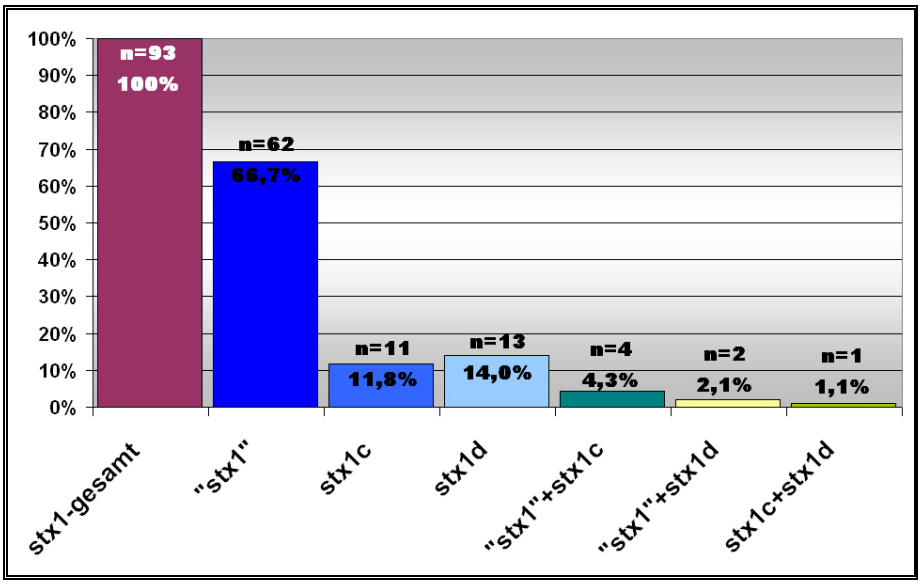


Abb. 10: Anteil von *stx1*-Varianten an *stx1*-positiven Proben

Im Bezug auf alle 124 *stx*-positiven Proben wurde die Kombination *stx1+stx2* mit 35 % (44 Proben) am häufigsten gefunden (Abb. 11). *Stx2* bzw. *stx1* alleine kam 31 (25 %) bzw. 18 mal (15 %) vor. Die Variante *stx1d* wurde nur in drei Proben als einziges *stx*-Gen nachgewiesen, dagegen in verschiedenen Kombinationen 13 mal. In drei Proben wurden drei verschiedene *stx*-Gene (*stx1*, *stx1c* bzw. *stx1d* und *stx2*) nachgewiesen.

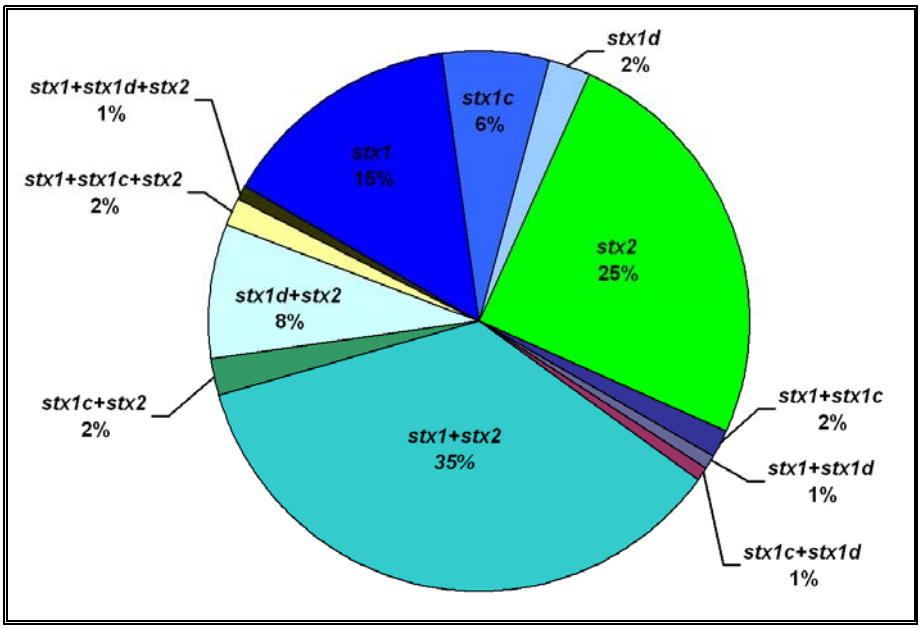


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen *stx*-Gene bzw. Kombinationen bei 124 positiven Proben

Nur in einem von den 38 beprobten Beständen war keine Probe *stx*-positiv, wobei nur 15-20 % der Kühe pro Bestand untersucht wurden (Abb. 12). Bei sechs Betrieben waren alle genommenen Proben *stx*-positiv. *Stx1c* wurde in neun Beständen, welche keinen direkten Kontakt zu Schafen hatten, nachgewiesen. Wobei in einem Betrieb in allen Proben (n = 3) *stx1c* gefunden wurde. *Stx1d* wurde in sechs verschiedenen Betrieben gefunden.

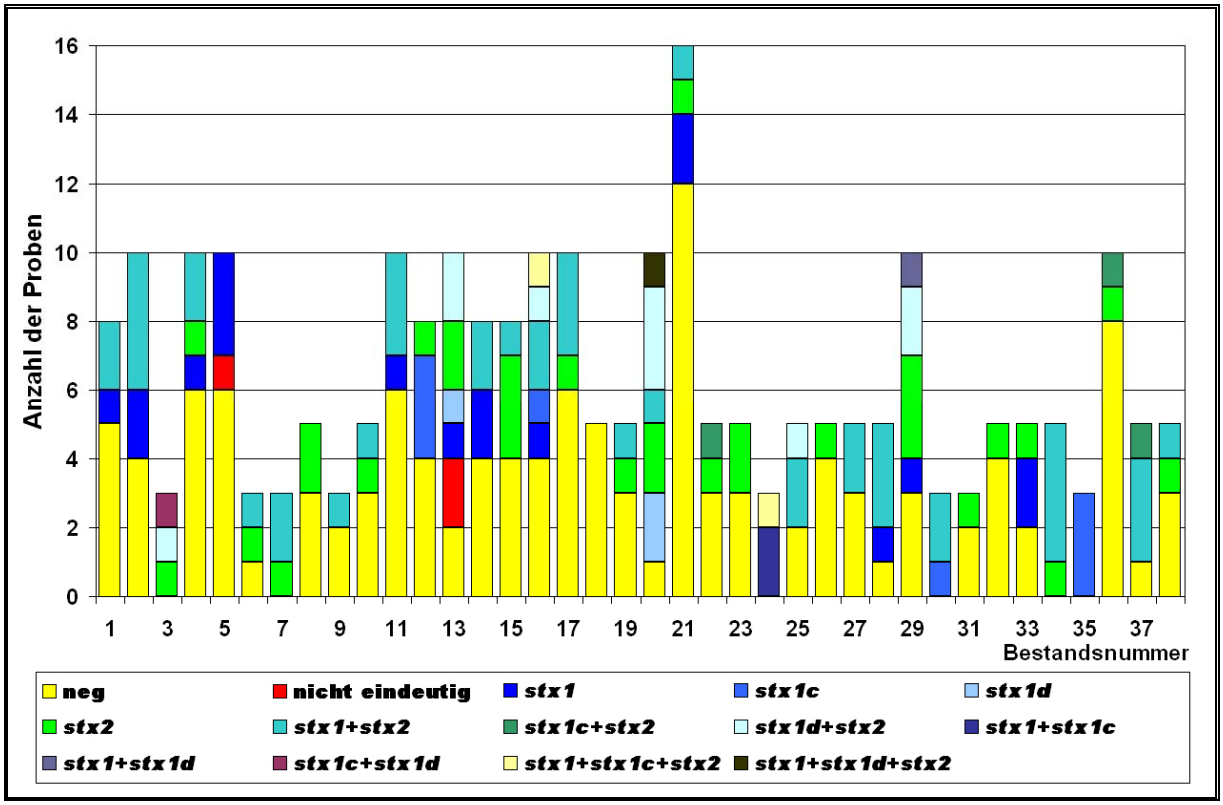


Abb. 12: Ergebnisse der einzelnen Betriebe

Von den 247 Proben wurden drei als nicht eindeutig eingestuft. Bei einer waren beide Screeninguntersuchungen negativ, aber die PCR mit VT1AvarF/VT1AvarR brachte ein positives Ergebnis, welches aber mit Hilfe der Schmelzkurve der real-time PCR nicht eindeutig bestätigt werden konnte. Der Schmelzkurvenpeak lag bei 63,1 °C und somit im Bereich von *stx1c*. Die zweite nicht eindeutig zuordenbare Probe war in beiden Screeninguntersuchungen und mit den Primern LP30/LP31 (*stx1*) positiv und die Schmelzkurve entsprach der von *stx1c*. Dieses Ergebnis konnte aber nicht mit den *stx1c* spezifischen Lin5/1OX3 bestätigt werden. Die dritte nicht eindeutige Probe wies nur beim Screening mit MK1/MK2 ein positives Ergebnis auf und es wurde mit LP43/LP44 ein *stx2*-Subtyp festgestellt. Dieser konnte auch mit dem LightCycler bestätigt werden, wobei aber zusätzlich noch ein Amplifikat mit der Schmelztemperatur von *stx1c* vorhanden war.

4.5 Ergebnisse der real-time PCR

Die real-time PCR mit dem LightCycler wurde zur Bestätigung der mit der konventionellen PCR gefundenen Ergebnisse eingesetzt. Es zeigte sich, dass mit Hilfe der Schmelzkurven der Sonden die einzelnen *stx1*-Varianten sehr gut differenziert werden konnten (Abb. 13). Am temperaturstabilsten ist die Bindung der Sonde an die Amplifikate des *stx1*-Prototyps mit einer Schmelztemperatur von ungefähr 67 °C. Dann folgt mit ca. 63 °C die Variante *stx1c* und mit ca. 61 °C *stx1d*.

In 127 Untersuchungen stimmten nur drei Proben nicht eindeutig mit den Ergebnissen der konventionellen PCR überein (siehe Abschnitt 4.4). Bei vier Proben war nach der PCR so unterschiedliche Mengen an Amplifikat je Variante vorhanden, dass die Unterscheidung der Peaks und somit die Differenzierung sich als schwierig erwies.

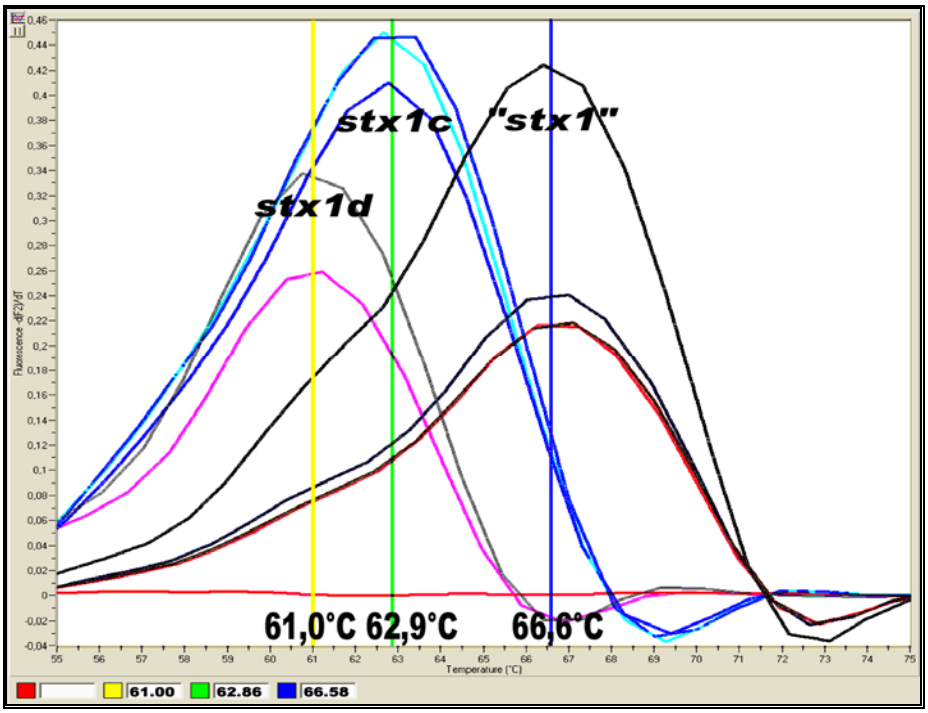
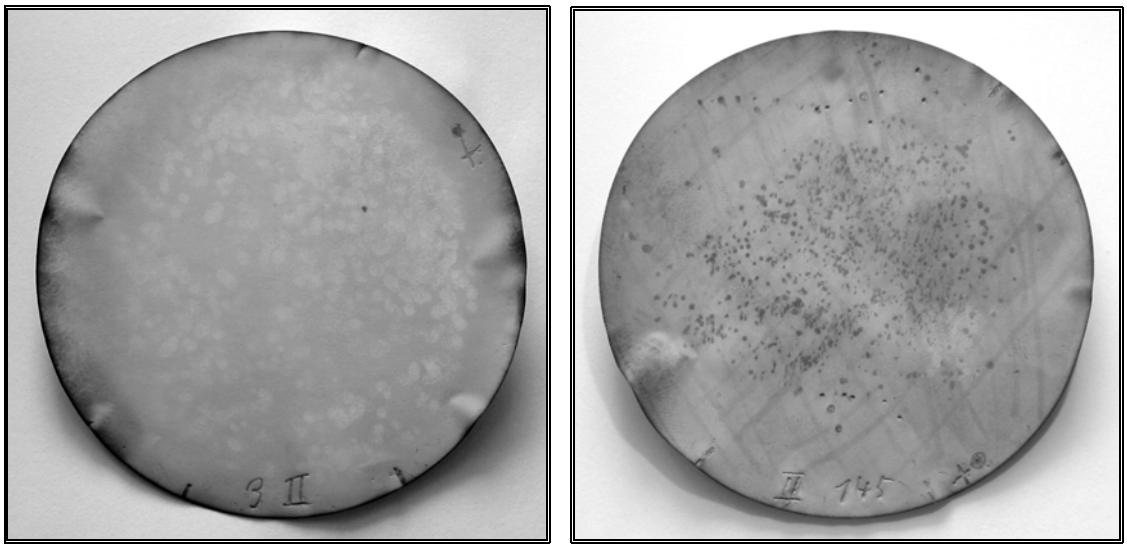


Abb. 13: Vergleich der Schmelzkurven von *stx1*, *stx1c* und *stx1d* in der real-time PCR

4.6 Kolonieblotergebnisse

Es konnten 35 STEC isoliert werden. Davon wurden nur drei durch das Picken von Einzelkolonien gefunden. Die anderen 32 STEC wurden in 129 Kolonieblots isoliert.

Die Abbildung 14 zeigt, dass die Menge an STEC von Probe zu Probe sehr stark schwanken kann. So war der Anteil der STEC an der Gesamtzahl der *E. coli* teilweise so gering, dass von ca. 300 Kolonien wiederholt keine *stx*-positiv war.



A: Ein STEC unter ca. 300 Kolonien **B:** Ca. jede 2. Kolonie ein STEC

Abb. 14: Beispiele für Kolonieblotergebnisse mit sehr niedrigem Anteil der STEC (**A**) und sehr hohem Anteil (**B**) an der Gesamtzahl der *E. coli*

4.7 Charakterisierung der Isolate

Die 35 Isolate konnten 27 verschiedenen Serotypen zugeordnet werden (Tab. 10); darunter waren drei typische EHEC-Serogruppen (O26, O103, O157). Alle fünf Isolate, die diesen drei Serogruppen angehörten, wiesen sowohl das *eae*-Gen als auch das Gen für das EHEC-Hämolysin auf. Das Isolat mit dem Serotyp O157:H$^-$ war Sorbitol fermentierend. Acht Isolate wiesen nur *stx1* und 13 *stx1* in Kombination mit einem *stx2*-Gen auf. *Stx2* kam vier mal alleine vor. Das *stx1c*-Gen wurde in vier Isolaten mit drei verschiedenen Serotypen gefunden, wovon zwei Isolate zusätzlich ein *stx2*-Gen und EHEC-*hly* aufwiesen.

Aus den 16 *stx1d*-positiven Proben konnten sechs STEC isoliert werden, die fünf verschiedenen Serotypen zugehörten und weder *stx2*, noch *eae* oder EHEC-*hly* positiv waren. Drei dieser Isolate trugen das Fimbrienantigen H48.

Alle *stx1c*- und *stx1d*-positiven Isolate zeigten im immunchromatischen Test Duopath® Verotoxin GLISA der Firma Merck eine deutlich positive Bande an der Stx1(VT1)-Marke (Abb. 15).

Die Nukleotidsequenzen der Amplifikate (1237 bp) aus der PCR mit den Primern VT1AF/VT1BR von sechs *stx1d*-positiven Isolaten waren zu 100 % homolog mit der Sequenz des Referenzstammes MHI813. Bei zwei Isolaten waren allerdings nur die Sequenzierungen mit dem Vorwärtsprimer VT1AF erfolgreich, sodass nicht die Sequenz des kompletten Amplikons vorlag, sondern nur ca. 700 Basen. Diese Primerkombination erbrachte bei dem *stx1c*-positiven Isolat (O136:H12) kein befriedigendes Ergebnis. Aber durch Ersetzen des Vorwärtsprimers mit Lin5 konnte ein großes PCR-Produkt (929 bp) hergestellt werden, welches eine 100 %ige Homologie zum Referenzstamm aufwies.

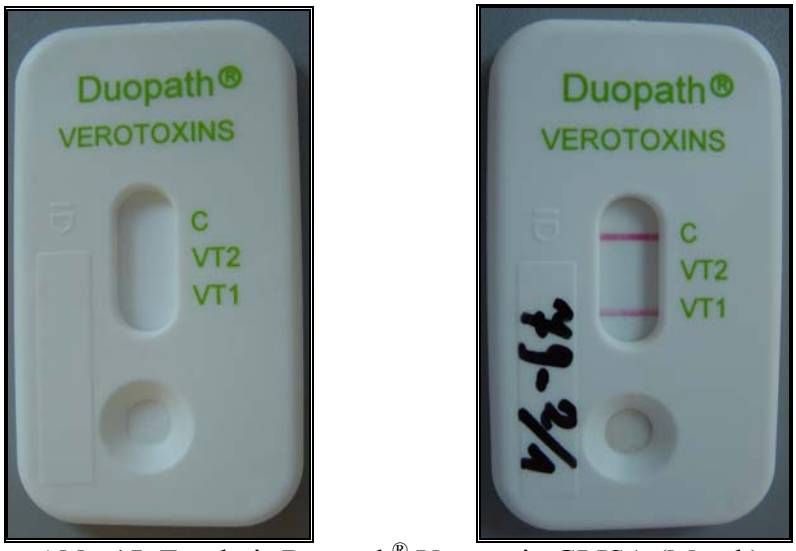


Abb. 15: Ergebnis Duopath® Verotoxin GLISA (Merck)
links: Testkit ohne Probe
rechts: Testkit mit Probe nach 20 min. Inkubation

Tab. 10: Charakterisierung der isolierten STEC

Serotyp	Anzahl	Virulenzfaktoren					
		stx1	***stx1c***	***stx1d***	***stx2***	***eae***	**EHEC-*hly***
O5:H$^-$	1	+	-	-	-	+	+
O8:H19	1	+	-	-	+	-	+
O11:H48	1	-	-	+	-	-	-
O17:H18	2	+	-	-	-	-	+
O22:H8	1	+	-	-	+	-	+
O26:H11	2	+	-	-	-	+	+
O55:H12	1	+	-	-	-	-	-
O74:H42	1	+	-	-	+	-	+
O76:H19	1	-	+	-	+	-	+
O91:H$^-$	1	+	-	-	-	-	+
O103:H2	1	+	-	-	-	+	+
O113:H4	1	+	-	-	+	-	-
O113:H4	1	-	-	-	+	-	-
O113:H4	1	-	+	-	+	-	+
O136:H12	2	-	+	-	-	-	-
O141:H19	1	-	-	+	-	-	-
O153:H$^-$	1	+	-	-	+	-	+
O153:H25	3	+	-	-	+	-	+
O157:H$^-$	1	-	-	-	+	+	+
O157:H7	1	+	-	-	+	+	+
O174:H2	2	+	-	-	+	-	+
O178:H19	2	+	-	-	+	-	+
O179(?):H31	1	-	-	-	+	-	-
On.t.:H$^-$	1	-	-	-	+	-	-
On.t.:H12	1	-	-	+	-	-	-
On.t.:H48	1	-	-	+	-	-	-
Osp:H48	2	-	-	+	-	-	-

5 Diskussion

Wiederkäuer stellen ein wichtiges Reservoir für STEC-Infektionen des Menschen dar (Griffin, 1995). Bei einigen HUS-Patienten konnte die Infektion in Verbindung mit direktem oder indirektem Kontakt zu Tieren oder von ihnen gewonnenen Lebensmitteln gebracht werden (Kudva et al., 1998). Das Ziel dieser Arbeit war, die Prävalenz von STEC, speziell solchen, die *stx1*-Varianten enthalten, in den Fäzes klinisch unauffälliger Milchkühe und Färsen festzustellen. Sowohl die Epidemiologie als auch die klinische Relevanz dieser Varianten für den Menschen sind bisher ungenügend geklärt.

Bei der Untersuchung von 247 Fäzesproben wurde bei 124 Proben (50,2 %) eindeutig mindestens ein *stx*-Gen nachgewiesen. Das bedeutet, dass jede zweite untersuchte Kuh *stx*-Träger war. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen liegt dieser Wert im oberen Bereich (Tab. 1). Bei Untersuchungen in Norwegen und Brasilien war die Prävalenz von *stx* im Rinderfäzes mit 64,6 % bzw. 71 % deutlich höher (Cerqueira et al., 1999; Urdahl et al., 2003). Geue et al. (2002) stellten in Deutschland eine Prävalenz von 29-82 % fest. In einer Veröffentlichung aus Japan waren gut ein Drittel (37,2 %) der Rinder mit STEC infiziert (Fukushima und Seki, 2004). Weitere Untersuchungen aus acht verschiedenen Ländern liegen mit Werten von 12 % bis 22,4 % weit unter dem in dieser Studie ermittelten Wert. Die erheblichen Schwankungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Studien dürften zum einen auf unterschiedliche Tierpopulationen, Fütterungseinflüsse, sowie auf geographische und saisonale Faktoren zum anderen aber auch auf differierende Beprobungs- und Nachweisverfahren zurückzuführen sein. Daher ist ein Vergleich der Daten nur mit Einschränkungen möglich. Trotzdem wird deutlich, dass die Prävalenz von *stx* in Rinderfäzes sehr hoch und das Rind als wichtiges STEC-Reservoire einzustufen ist.

Von den 124 positiven Proben waren 33 (26,6 %) *stx1*, 31 (25,0 %) *stx2* und 60 (48,4 %) *stx1*- und *stx2*-positiv. In den Untersuchungen anderer Autoren wurden höhere Anteile an *stx2*-Genen bei Rindern angegeben (Tab. 2). So stellten Zschöck et al. (2000) in Deutschland einen wesentlich höheren Anteil (45,8 %) an Proben, die nur *stx2* enthielten fest, wobei nur 18 % der Rinder in dieser Untersuchung *stx*-positiv waren. In der vorliegenden Studie konnte dagegen bei über 50 % der Fäzesproben ein *stx*-positives Ergebnis diagnostiziert werden. Da die in der vorliegenden Untersuchung angewendeten Verfahren durch den Einsatz von variantenspezifischen Primern die *stx1*-Gene, insbesondere *stx1d*, besser erfassen, war ein höherer Anteil an *stx1*-positiven Proben zu erwarten. Bei drei von den in der Tabelle 2

genannten Untersuchungen liegt der Anteil der *stx1*- und *stx2*-positiven Proben an der Gesamtzahl der *stx*-positiven Proben, ebenso wie in dieser Studie, annähernd bei 50 %. Dieser Wert gibt jedoch keinen Aufschluss, ob in einer Probe ein STEC vorhanden war, der beide Subtypen codiert oder mehrere STEC, die unterschiedliche *stx*-Gene aufweisen.

Die Variante *stx1c* wurde in Deutschland bislang nur beim Schaf und bei Isolaten vom Mensch, jedoch nie beim Rind festgestellt. In der vorliegenden Untersuchung konnte diese Variante dagegen bei 16 Kotproben (6,5 %) gefunden werden. Umgerechnet auf die *stx1*-Subtyp positiven Proben (93 Stück) bedeutet dies, dass fast jede fünfte *stx1*-positive Probe dieses Gen alleine oder in Kombination besaß.

Zum Screening der Fäzesproben auf *stx*-Gene wurden die beiden Primerpaare MK1/MK2 und Lin3/Lin5 eingesetzt (Tab. 7).

Sieben Proben konnten, obwohl beide Primerpaare ein positives Ergebnis zeigten, nicht bestätigt werden (Tab. 9). Bei 38 Proben, von denen sich 28 bestätigen ließen, zeigten nur die Primer MK1/MK2, nicht aber Lin3/Lin5 ein positives Ergebnis. Nur bei drei Proben, von denen sich zwei bestätigen ließen, war das Ergebnis umgekehrt mit Lin3/Lin5 positiv und mit MK1/MK2 negativ. Insgesamt betrachtet konnten 17 von 134 MK1/MK2-positiven bzw. acht von 99 Lin3/Lin5-positiven Proben nicht bestätigt werden. In sieben Fällen, von denen fünf *stx1d*-positiv waren, konnte mit MK1/MK2 das Vorhandensein von *stx*-Genen nicht nachgewiesen werden. Bei 33 Proben, von denen sieben *stx1d* positiv waren, war das Ergebnis der Primer Lin3/Lin5 falsch negativ.

Diese Untersuchungen zeigen, dass MK1/MK2 mehr *stx*-Gene erfassen als Lin3/Lin5, aber auch mehr falsch positive Ergebnisse erbringen. Dies hat jedoch bei Screeninguntersuchungen weniger Relevanz, da die positiven Proben anschließend noch mit einer anderen Methode bestätigt bzw. differenziert werden. Demgegenüber sind bei Verwendung von Lin3/Lin5 vermehrt falsch negative Ergebnisse zu erwarten. Insgesamt unterstreichen diese Resultate die Problematik, mit einem Primerpaar alle *stx*-Gene zu erfassen. Beide Screeningprimerpaare geben für *stx1d* keine befriedigenden Ergebnisse und wurden deswegen in dieser Arbeit durch eine zusätzliche Untersuchung mit dem *stx1d*-spezifischen Primerpaar VT1AvarF/VT1AvarR ergänzt. Dabei zeigte sich, dass diese Primer eine hohe Spezifität für *stx1d* aufweisen. Von 17 positiven Proben konnten 16 anhand der Schmelzkurve der real-time PCR bestätigt werden. Lediglich eine Probe konnte nicht bestätigt werden, da die Schmelzkurve in diesem Fall nicht eindeutig auswertbar war.

Für *stx1c* erwies sich das Primerpaar Lin5/1OX3 wesentlich spezifischer als stx1c-1/stx1c-2. In der PCR mit den letzt genannten Primern zeigen auch die *stx1d*-positiven Proben eine

deutliche Bande (Abb. 9). Diese Primer liegen in Sequenzabschnitten, die einen hohen Grad an Homologie zwischen *stx1c* und dem später publizierten *stx1d* aufweisen (Abb. 4). Da die Spezifität des stx1c-1/stx1c-2 Primerpaars auch nicht durch schrittweise Erhöhung der Annealingtemperatur verbessert werden konnte (Abb. 9), ist dieses Primerpaar für den spezifischen Nachweis von *stx1c* nicht geeignet, kann jedoch, wenn für bestimmte Fragestellungen erforderlich, die Varianten *stx1c* und *stx1d* gleichzeitig nachweisen.

Bei den drei fraglichen Proben konnte das Ergebnis der konventionellen PCR (je eine Probe positiv mit VT1AvarF/VT1AvarR, LP30/LP31 und LP43/LP44) nicht eindeutig mit der real-time PCR bestätigt werden. Die Schmelzkurve des *stx1*-Kanals hatte auch nach wiederholten Versuchen ihren Peak in allen drei Fällen bei ca. 63 °C und entsprach damit der von *stx1c*. Aber die *stx1c*-spezifische PCR mit Lin5/1OX3 erbrachte ein negatives Ergebnis.

Das *stx2*-Gen der LP43/LP44-positiven Probe konnte mit dem LightCycler bestätigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass bei den anderen beiden Proben ein *stx1*-Gen vorhanden war, da auch die konventionelle PCR mit einem Primerpaar ein positives Ergebnis hervor brachte. Die verwendete real-time PCR weist, bedingt durch den Einsatz von Hybridisierungssoden, eine im Vergleich zur klassischen PCR wesentlich höhere Spezifität auf. Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um falsch positive Ergebnisse handelte gering.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der konventionellen PCR und der Schmelzkurve der real-time PCR wurde möglicherweise durch eine Abweichung der Gensequenz von den derzeit bekannten *stx1*-Sequenzen verursacht. Diese drei Proben wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Obwohl, abgesehen von fünf sehr kleinen Beständen (< 15 Tiere), nur ca. 10-20 % der Kühe pro Bestand untersucht wurden, konnte in 37 (97,4 %) der 38 beprobten Bestände *stx* nachgewiesen werden (Abb. 12). Im Vergleich zu anderen Literaturdaten (Tab. 1) fällt dieser Wert mit nahe 100 % relativ hoch aus, dürfte jedoch teilweise auch methodisch durch das intensive Screening mit mehreren Primerpaaren bedingt sein.

Die Variante *stx1c* wurde erstmals in einem Isolat vom Schaf nachgewiesen (Paton et al., 1995) und bisher hauptsächlich mit dieser Tierart assoziiert. Darüber hinaus wurde diese Variante in mehreren Untersuchungen bei Isolaten von gesunden oder an unkomplizierten Enteritiden erkrankten Menschen gefunden (Koch et al., 2001, Zhang et al., 2002a, Brett et al., 2003). Bei Rindern wurde *stx1c* nur in einer Studie aus Australien nachgewiesen (Brett et al., 2003). In zwei weiteren Untersuchungen in Deutschland (27 STEC-Isolate vom Rind) und in Norwegen (79 Kotproben) wurde *stx1c* dagegen unter Verwendung der gleichen PCR-Primer wie in der vorliegenden Arbeit in keinem Fall gefunden (Koch et al., 2001, Urdahl et

al., 2003). Brett et al. (2003) wiesen *stx1c* dagegen in 5,8 % von 104 bovinen STEC nach. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass für diese Untersuchung nur *stx1*-positive Isolate verwendet wurden. Rückschlüsse auf die Prävalenz von *stx1c* beim Rind sind aus diesen Daten nicht möglich. Bezogen auf die *stx1*-positiven Proben ergab sich in der vorliegenden Arbeit mit 17,2 % ein deutlich höherer Anteil von *stx1c*. Insgesamt lag die Prävalenz von *stx1c* bei 6,5 % der untersuchten Tiere, die sich auf zehn Betriebe in verschiedenen Landkreisen verteilten. Hervorzuheben ist, dass in keinem dieser Betriebe Schafe gehalten wurden. Ob ein Zusammenhang mit Wanderschafhaltung in den entsprechenden Gebieten besteht, konnte in diesem Rahmen nicht geklärt werden.

Stx1d wurde ebenfalls nicht fokal, sondern in sechs verschiedenen Betrieben über das Untersuchungsgebiet verteilt nachgewiesen. In der Literatur liegen derzeit keine epidemiologischen Daten über das Vorkommen von *stx1d* vor. Diese Variante wurde erstmals von der Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch in einem STEC boviner Herkunft in Deutschland beschrieben, (Bürk et al., 2003), und kurze Zeit später in einem bovinen Isolat in Japan nachgewiesen (Ohmura-Hoshino et al., 2003). Kuczius et al. (2004) fanden bei der Untersuchung von 206 humanen *stx1*-positiven STEC mit der auch in dieser Arbeit verwendeten real-time PCR-Methode von Reischl et al. (2002) einen Stamm, der ein Amplikon mit der identischen Schmelztemperatur der Sonden wie *stx1d* erbrachte. Damit wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit *stx1d* erstmals beim Menschen nachgewiesen.

EHEC-Isolate und Isolate von HUS-Patienten wiesen in verschiedenen Untersuchungen zu über 94 bzw. 92 % sowohl *eae* als auch EHEC-*hly* auf (Karch et al., 1997, Gyles et al., 1998). Die Tatsache, dass keines der fünf *stx1d*-positiven Isolate zusätzlich einen weiteren Virulenzfaktor codierte, weist darauf hin, dass die Pathogenität dieser Isolate eher niedrig ist. Das von Ohmura-Hoshino et al. (2003) beschriebene Isolat, das ein mit *stx1d* identisches Gen besitzt, wies dagegen EHEC-*hly* auf. Für eine Beurteilung der Pathogenität von *stx1d* liegen insgesamt noch zu wenige Daten vor. Die Variante ist im Zytotoxizitätstest biologisch aktiv, wenn auch wesentlich schwächer als der Prototyp, und weist *in vitro* nahezu identische Enzymaktivität wie der Prototyp auf (Bürk et. Al., 2003, Ohmura-Hoshino et al., 2003).

Die Anreicherungen wiesen häufig einen geringen Anteil an STEC im Verhältnis zu der Gesamtzahl vorhandener *E. coli* auf, so dass nur drei STEC durch das Picken von Einzelkolonien isoliert werden konnten. Auch durch wiederholte Kolonieblots konnte der STEC häufig nicht gefunden werden. Rogerie et al. (2001) konnten bei ihren Untersuchungen, die eine *stx*-Prävalenz von 18,1 % ergaben (Tab.1), 40 % der STEC isolieren. Mit dem in der vorliegenden Studie angewandtem Untersuchungsverfahren konnten bei einer Prävalenz von

über 50 % 35 STEC (29 %) aus 124 Proben isoliert werden. Die niedrigere Isolierungsrate könnte darin begründet sein, dass im Gegensatz zu der oben genannten Untersuchung eine Unteranreicherung durchgeführt wurde und dadurch eine höhere Sensitivität der PCR-Untersuchungen erreicht wurde, da Matrixeffekte durch Kotbestandteile reduziert wurden.

Von den 35 Isolaten gehören fünf zu typischen EHEC-Serogruppen (O26, O103, und O157) (Tab. 10). Alle fünf Isolate wiesen zu den *stx*-Genen zusätzlich das *eae*-Gen und EHEC-*hly* auf und sind deswegen als hoch pathogen einzustufen. Eines der Isolate entsprach dem klassischen EHEC-Serotyp O157:H7 und bei einem weiteren handelte es sich um ein Sorbit fermentierendes Isolat mit dem Serotyp O157:H$^-$. Letzterer Serotyp ist besonders im Mitteleuropäischen Raum wiederholt als Erreger schwerer EHEC-Erkrankungen und -Ausbrüche in Erscheinung getreten (Karch und Bielaszewska, 2001). Insgesamt war der Anteil an Isolaten mit mutmaßlich hoher Virulenz relativ groß. Rogerie et al. (2001) hatten in ihren Untersuchungen nur bei 3,2 % der Isolate *eae* gefunden, in den eigenen Untersuchungen lag dieser Wert jedoch bei 14,2 %. Auch der Anteil an Isolaten, die *eae* und EHEC-*hly* aufwiesen, war mit ebenfalls 14,2 % erheblich höher als der von Rogerie et al. (2001) angegebene Wert von 1,3 %. Blanco et al. (2004) fanden dagegen *eae* in 29 % der bovinen STEC-Isolate. Das bestätigt, dass das Rind als Infektionsquelle für EHEC-Erkrankungen von großer Bedeutung ist.

Am häufigsten wurden die Serotypen O153:H25 und O113:H4 aus verschiedenen Betrieben isoliert, wobei der zuletzt genannte in drei unterschiedlichen Virulenzprofilen auftrat. *Stx1d* scheint häufig mit bisher nicht typisierbaren somatischen Antigenen assoziiert zu sein. Zwei der sechs Isolate waren ebenso wie der Referenzstamm MHI813 nicht typisierbar, zwei weitere agglutinierten spontan. Die vier *stx1c*-positiven Isolate verteilten sich auf drei verschiedene Serotypen (O76:H19, O113:H4, O136:H12), von denen die beiden ersten bereits in Verbindung mit *stx1c* bei Isolaten vom Schaf nachgewiesenen wurden (Zweifel et al., 2004). Im Gegensatz zu *stx1d* trat *stx1c* in verschiedenen Studien zusammen mit den Virulenzfaktoren *stx2* oder EHEC-*hly* auf (Zhang et al., 2002a; Zweifel et al., 2004). Da das *eae*-Gen aber noch nie zusammen mit dieser Variante nachgewiesen werden konnte, wird *stx1c* in Verbindung mit milderem Krankheitsverlauf oder asymptomatischen Infektionen gebracht (Koch et al., 2001). Auch in dieser Studie konnte zusätzlich ein *stx2*-Gen und das EHEC-Hämolysin bei zwei *stx1c*-positiven Isolaten nachgewiesen werden, aber nicht das *eae*-Gen. Zhang et al. (2002a) konnten bei einem Isolat von einem Patienten mit HUS zwar *stx1c* nachweisen, aber auch zusätzlich *stx2* und das EHEC-Hämolysin. Ob *stx1c* allein HUS auslösen kann ist daher fraglich.

Die Teilsequenzierung der *stx1d*-Gene der in der vorliegenden Studie gefundenen Isolate erbrachten eine 100 %ige Homologie zum Referenzstamm MHI813. Außerdem konnte bei einem ca. 900 bp großem Amplifikat eines *stx1c*-Isolates ebenfalls 100 %ige Homologie zum Referenzstammgen nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Zhang et al. (2002a), die 14 *stx1c*-positive Isolate sequenzierten und eine 100 %ige Übereinstimmung mit der von Paton et al. (1995) publizierten Sequenz feststellten. Nur ein von Ohmura-Hoshino et al. (2003) beschriebenes *stx1d*-Isolat 92-1251 wies zwei von *stx1d*-abweichende Nukleotide auf, die jedoch nicht zu einer Abweichung in der Proteinsequenz führten. Auf Grund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die beiden *stx1*-Varianten einer sehr niedrigen Mutationsrate unterliegen. Ein phylogenetischer Vergleich der Sequenzen der verschiedenen *stx*-Sequenzen deutet darauf hin, dass sie einen gemeinsamen Vorläufer haben (Bürk et al., 2003). Dies könnte bedeuten, dass neben den bekannten Varianten weitere existieren, die mit den verwendeten PCR-Methoden nicht erfasst werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Varianten *stx1c* und *stx1d* in Rinderbeständen weit verbreitet vorkommen. Zu klären bleibt die Pathogenität von Stx1d für den Menschen und die Prävalenz dieser Variante beim Menschen sowie bei weiteren Tierarten, insbesondere bei Schafen.

6 Zusammenfassung

Bislang wurde angenommen, dass Shiga Toxin 1 (Stx1) im Gegensatz zu Stx2, von dem zahlreiche Varianten existieren, relativ homogen ist. Es waren nur wenige Stx1-Varianten bekannt und diese wiesen mit einer Ausnahme eine Homologie von 99 % mit dem Prototyp aus Phage 933J auf. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch von Stx1 mehrere Varianten existieren (Stx1c bzw. Stx1OX3, Stx1d und Stx1v52), die deutlich vom Prototyp abweichen (92-97 % Homologie der Aminosäuresequenzen).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen von Stx1-Varianten bei klinisch unauffälligen Rindern, einem wichtigen Reservoir für STEC, untersucht. Dazu wurden 247 Rinderkotproben aus 38 südbayerischen Betrieben nach einer Anreicherungskultur mit PCR auf das Vorhandensein von *stx*-Genen untersucht und positive Proben mit spezifischen Primern für die unterschiedlichen *stx*-Suptypen bzw. *stx1*-Varianten typisiert. Die Isolierung der Keime erfolgte durch Kolonieblothybridisierung.

Von den 247 Fäzesproben waren in 124 (50,2 %) Shigatoxin-Gene nachweisbar. Bei der Feindifferenzierung der positiven Proben wiesen 33 nur *stx1*, 31 nur *stx2* und 60 beide Subtypen auf. Von den 93 *stx1*-positiven Proben enthielten jeweils 16 die Variante *stx1c* bzw. *stx1d*. Von den 35 isolierten STEC wiesen sechs, von welchen fünf zu typischen EHEC-Serogruppen (O26, O103 und O157) gehörten, das *eae*-Gen auf. Ein *stx1*-, *stx2*-, *eae*- und EHEC-*hly*-positiver O157:H7 sowie ein Sorbit fermentierender O157:H^- wurden isoliert. Bei 23 Isolaten konnte EHEC-*hly* nachgewiesen werden. Vier Isolate mit drei verschiedenen Serotypen (O76:H19, O113:H4, O163:H12 [n=2]) wiesen die Variante *stx1c* auf, wobei zwei dieser Isolate zusätzlich ein *stx2*-Gen und das EHEC-*hly* besaßen. Bei den sechs *stx1d*-positiven STEC, die den Serogruppen O11:H48, O141:H19, On.t.:H12, On.t.:H48 und Osp:H48 [n=2] angehörten, konnten keine weiteren Virulenzfaktoren nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse bestätigen die hohe Prävalenz von STEC beim Rind. Außerdem konnte belegt werden, dass die *stx*1-Varianten *stx1c* und *stx1d* mit einer Häufigkeit von je 6,5 % in einem beachtlichen Anteil der 247 Kotproben vorhanden waren. Das Auftreten von *stx1c* konnte dabei nicht in direkten Bezug mit dem Kontakt zu Schafen gebracht werden. Da die *stx1d*-positiven Isolate keine anderen Virulenzfaktoren besaßen, dürfte ihre Pathogenität eher niedrig sein.

7 Summary

Prevalence of Shiga toxin 1 variants in cattle in Southern Bavaria

Until recently it was supposed, that Shiga toxin 1 (Stx1) unlike Stx2, of which several variants exist, was highly conserved. With one exception the nucleotide sequence of all known *stx1* variants was 99 % homologous with *stx1* from phage 933J. But recent studies proved, that there are more variants of the Stx1 subtype (Stx1c respectively Stx1OX3, Stx1d respectively Stx1v52), which differ considerably from Stx1 encoded by phage 933J (92-97 % homology of the amino acid sequences).

In this study the prevalence of *stx1* variants in healthy cattle, a very important reservoir for STEC, was examined. Faecal samples from 247 cattle of 38 south Bavarian dairy farms were tested for the presence of Shiga toxin genes by PCR after enrichment culture. Positive samples were subtyped by primers specific for different *stx* subtypes and *stx1* variants, respectively. STEC were isolated by colony hybridization technique.

Shiga toxin genes could be found in 124 (50,2 %) out of the 247 faecal samples. Thirty three of the positive samples harboured only *stx1*, 31 only *stx2* and 60 samples harboured both *stx1* and *stx2*. In 16 of the 93 *stx1* positive samples the variant *stx1c* was detected and also in sixteen of these samples the variant *stx1d*. Six of the 35 isolated STEC, five of which belonged to typical EHEC serogroups (O26, O103 and O157), were *eae* positive. One *stx1*, *stx2*, *eae* and EHEC-*hly* positive O157:H7 and one sorbitol fermenting O157:H^- could be isolated. *Stx1c* was identified in four isolates which belonged to tree different serotypes (O76:H19, O113:H4, O163:H12 [n=2]). Two of these possessed the *stx2* gene and additionally the EHEC-*hly*. None of the six *stx1d* positive Isolates, which belonged to the serogroups O11:H48, O141:H19, On.t.:H12, On.t.:H48 and Osp:H48 [n=2], harboured further virulence factors.

The results confirm the high prevalence of STEC in cattle. Besides it was verified, that the *stx1* variants *stx1c* and *stx1d* can frequently be identified in cattle faeces (6,5 % each of 247 faeces samples). The occurence of *stx1c* could not be associated with direct contact to sheep. The fact that *stx1d* was never associated with other virulence factors suggests a rather low pathogenicity of STEC harbouring this variant.

8 Literaturverzeichnis

Adu-Bobie J., Frankel G., Bain C., Goncalves A.G., Trabulsi L.R., Douce G., Knutton S., Dougan G., 1998.
Detection of intimins α, β, χ and δ, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens.
J. Clin. Microbiol. **36:**662-668.

Ahmed S., Donaghy M., 1998.
An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central scotland.
In: Kaper J.B., O´Brien A.D. (Hrsg.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin producing *Escherichia coli* strains.
American Society for Microbiol., Washington D.C., pp. 59-65.

Armstron G.L., Hollingsworth J., Morris J.G.Jr., 1996.
Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world.
Epidemiol. Rev. **18:**29-51.

Ashkenazi S., Cleary T.G., Lopez E., Pickering L.K., 1988.
Anticytotoxin-neutralizing antibodies in immune globulin preparations: potential use in hemolytic uremic syndrome.
J. Pediatrics **113:**1008-1014.

Azavedo de J., Mc Whirter E., Louie M., Brunton J., 1994.
EAE-negative verotoxin-producing *Escherichia coli* associated with hemolytic uremic syndrome and hemorrhagic colitis.
In: Karmali M.A., Goglio A.G. (Hrsg.), Recent advances in verocytotoxin producing *Escherichia coli* infections.
Elsevier, Amsterdam, pp. 265-268.

Bell B.P., Goldoft M., Griffin P.M., Davis M.A., Gordon D.C., Tarr P.I., Bartleson C.A., Lewis J.H., Barret T.J., Wells J.G., Baron R., Kobayashi J., 1994.
A multistate outbrake of *Escherichia coli* O157:H7-associated blood diarrhoea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers.
JAMA **272:**1349-1353.

Bettelheim K.A., 2003.
Serotypes of VTEC.
http://www.microbionet.com.au/vtectable.htm.

Beutin L., Geier D., Steinrück H., Zimmermann S., Scheutz F., 1993.
Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals.
J. Clin. Microbiol. **31:**2483-2488.

Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Gleier K., 2004.
Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period.
J. Clin. Microbiol. **42:**1099-1108.

Blanco J., Gonzalez E.A., Bernadez I., Regueiro B., 1983.
Differentiated biological acivity of Verocytotoxins (VT) released by human and porcine *Escherichia coli* strains.
Federation of European Microbiol. Societies, Microbiol. Letters **20:**167-170.

Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., Gonzalez E.A., Bernárdez M.I., 2001.
Epidemiology of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants.
In: Duffy G., Garvey P., McDowell D.A. (Hrsg.), Verocytotoxigenic *Escherichia coli.*
Food & Nutrition Press, Trumbull, Conn., pp. 113-148.

Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Rey J., Alonso J.M., Hermoso M., Hermoso J., Alonso M.P., Dahbi G., Gonzalez E.A., Bernardez M.I., Blanco J., 2003.
Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain.
J. Clin. Microbiol. **41:**1351-1356.

Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dahbi G., Alonso M.P., Gonzalez E.A., Bernardez M.I., Blanco J., 2004.
Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene.
J. Clin. Microbiol. **42:**645-651.

Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso M.P., González E.A., Bernárdez M.I., o.J.
O:H serotypes of human verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC).
http://www.lugo.usc.es/ecoli/.

Bockemühl J., Karch H., 1996.
Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland.
Bundesgesundheitsblatt **39:**290-296.

Borman-Eby H.C., Mc Ewen S.A., Clarke R.C., Mc Nab W.B., Rahn K., Valdivieso-Garcia A., 1993.
The seroprevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* in Ontario dairy cows and associations with production and management.
Preventive Veterinary Medicine **15:**261-274.

Brett K.N., Ramachandran V., Michael A., 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:**926-936.

Bülte M., 1995.
Enterohaemorrhagische *Escherichia coli*-Stämme (EHEC) – aktuell in der Bundesrepublik Deutschland? 1. Pathogenitätspotential von EHEC-Stämmen – Bedeutung als Lebensmittel-infektionserreger (Literaturübersicht).
Fleischwirtschaft **75:**1430-1432.

Bürk C., Dietrich R., Acar G., Moravek M., Bülte M., Märtelbauer E., 2003.
Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of Bovine Origin.
J. Clin. Microbiol. **41:**2106-2112.

Cebula T.A., Payne W.L., Feng P., 1995.
Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR.
J. Clin. Microbiol. **33:**248-250.

Cerqueira A.M., Guth B.E., Joaquim R.M., Andrade J.R., 1999.
High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil.
Vet. Microbiol. **70:**111-21.

Chanter A., Morgan J.H., Bridger J.C., Hall G.A., Reynolds D.J., 1984.
Dysentery in gnotobiotic calves caused by atypical *Escherichia coli*.
Vet. Rec. **114:**71.

Čižek A., Alexa P., Literak I., Hamrik J., Novak P., Smola J., 1999.
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle and Norwegian rats from a large-scale farm.
Lett. Appl. Microbiol. **28:**435-439.

Cowden J.M., Cristie P., 1997.
Scottish outbreak of *Escherichia coli* 157.
Health. Bull. Edinb. **55:**9-10.

Donnenberg M.S., Whittam T.S., 2001.
Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
J. Clin. Invest. **107:**539-48.

Donohue-Rolfe A., Keusch G.T., Edson C., Thorley-Lawson D., Jacewicz M., 1984.
Pathogenesis of shigella diarrhoea.
J. Exp. Med. **160:**1767-1781.

Friedrich A.W., Borell J., Bielaszewska M., Fruth A., Tschape H., Karch H., 2003.
Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease.
J. Clin. Microbiol. **41:**2448-2453.

Fukushima H., Seki R., 2004.
High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan.
FEMS Microbiol. Lett. **238:**189-197.

Gerber A., Karch H., Allerberger F., Verweyen H.M., Zimmerhackl L.B., 2002.
Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study.

J. Infect. Dis. **186:**493-500.

Geue L., Segura-Alvarenz M., Conraths F.J., Kuczius T., Bockemuhl J., Karch H., Gallien P., 2002.
A long-term study on the prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on four cattle farms.
Epidem. Infect. **129:**173-185.

Gioffre A., Meichtri L., Miliwebsky E., Baschkier A., Chillemi G., Romano M.I., Sosa Estani S., Cataldi A., Rodriguez R., Rivas M., 2002.
Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina. Evaluation of two procedures.
Vet. Microbiol. **87:**301-313.

Griffin P.M., 1995.
Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
In: Blaser M.F., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrant R.L. (Hrsg.), Infections of Gastrointestinal Tract.
Raven press Ltd., New York, N.Y. pp. 739-761

Griffin P.M., Tauxe R.V., 1991.
The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated haemolytic uremic syndrome.
Epidemiol. Rev. **3:**60-68.

Gyles C., Johnson R., Gao A., Ziebell K., Pierard D., Aleksic S., Boerlin P., 1998.
Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins.
Environ. Microbiol. **64:**4134–4141.

Heißenhuber A., 2004.
EHEC (enterohämorrhagische Escherichia coli-Bakterien).
http://www.lgl.bayern.de/de/left/ fachinformationen/gesundheit/ehec.htm.

Jackson M.P., 1990.
Structure-function analyses of Shiga toxin and the Shiga-like toxins.
Microbiol. Pathogen. **8:**235-42.

Jackson M.P., Newland J.W., Holmes R.K., O'Brien A.D., 1987.
Nucleotide sequence analysis of the structural genes for shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli.*
Microbiol. Pathogen. **2:**147-153.

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 southwest part of Norway during 1998 and 1999.
Int. J. Food Microbiol. **65:**193-200.

Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L., 2004.
Pathogenic *Escherichia coli*.
Nat. Rev. Microbiol. **2:**123-40.

Karch H., Meyer T., 1989.
Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase-chain-reaction.
J. Clin. Microbiol. **27:**2751-2757.

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:**2043-2049.

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:**516-519.

Karch H., Huppertz H.I., Bockenmuhl J., Schmidt H., Schwarzkopf A., Lissner R., 1997.
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany.
J. Food Prot. **60:**1454-1457.

Karmali M.A., 1989.
Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*.
Clin. Microbiol. Rev. **2:**15-38.

Karmali M.A., Steel B.T., Petric M., Lim C., 1983.
Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin-producing *Escherichia coli*.
Lancet **1:**619-620.

Khan A., Yamasaki S., Sato T., Ramamurthy T., Pal A., Datta S., Chowdhury N.R., Das S.C., Sikdar A., Tsukamoto T., Bhattacharya S.K., Takeda Y., Nair G.B., 2002.
Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India.
Emerg. Infect. Dis. **8:**54-62.

Koch C., Hertwig S., Lurez R., Appel B., Beutin L., 2001.
Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the *stx$_{1OX3}$* gene, wich is closley associated with Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans.
J. Clin. Microbiol. **39:**3992-3998.

Kuczius T., Bielaszewska M., Friedrich A.W., Zhang W., 2004.
A rapid method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, *Stx1c* and *Stx1d*, in *Escherichia coli*.
Mol. Nutr. Food Res. **48:**515-521.

Kudva I.T., Blanch K., Jovde C.J., 1998.
Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry.
Appl. Environ Microbiol. **64:**3166-3174.

Leomil L., Aidar-Ugrinovich L., Guth B.E.C., Irino K., Vettorato M.P., Onuma D.L., de Castro A.F.P., 2003.

Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil.
Vet. Microbiol. **97:**103-109.

Liddel K.G., 1997.
Escherichia coli O157: outbreak in central Scotland.
Lancet **349:**502-503.

Lin Z., Kurazono H., Yamasaki S., Takeda Y., 1993.
Detection of various variant Verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction.
Microbiol. Immunol. **37:**543-548.

Lingwood C.A., Law H., Richardson S., Petric M., Brunton J.L., de Grandis S., Karmali M.A., 1987.
Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro.
J. Biolog. Chemist. **262:**8834-8839.

McSweeney C.S., Gilbert R.A., Krause D.O., Padmanabha J., Denman S.E., 2004.
Effect of diet on *E. coli* populations in the faeces of cattle.
Asia Pac. J. Clin. Nutr. **13:**27.

Michino H., Araki H., Minami S., Al E.T., 1998.
Recent outbrakes of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan.
In: Kaper J.B., O´Brien A.D. (Hrsg.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin producing *Escherichia coli* strains.
ASM Press, Washington D.C. pp. 73-81.

Misselwitz J., Karch H., Bielazewska M., John U., Ringelmann F., Ronnefarth G., Patzer L., 2003.
Cluster of hemolytic-uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11.
Pediatr. Infect. Dis. J. **22:**349-354.

Neely M.N., Friedman D.I., 1998.
Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of Shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release.
Mol. Microbiol. **28:**1255-1267.

O'Brien A.D., LaVeck G.D., 1983.
Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by *Escherichia coli*.
Infect. Immun. **40:**675-83.

Ohmura-Hoshino M., Soon-Tae H., Hisao K., Kazuei I., Shinji Y., Yoshifumi T., 2003.
Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga Toxin 1 from bovine *Escherichia coli* Strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin.
Microbiol. Immunol. **47:**717-725.

Osek J., Winiarczyk S., 2001.
Prevalence of *eae* and shiga toxin genes among *Escherichia coli* strains isolated from healthy

calves.
J. Vet. Med. **48:**67-72.

Osek J., Gallien P., Protz D., 2000.
Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **23:**267-276.

Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marchés O., Caprioli A., 2000.
Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant.
Infect. Immun. **68:**64-71.

Otawa K., Sato M., Sasaki T., Sasaki H., Nonaka J., Ito K., Kuroki T., Nakai Y., 2004.
Genetic analysis of shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from cattle in a limited region.
Animal Science J. **75:**261-269.

Panutdaporn N., Chongsa-nguan M., Nair G.B., Ramamurthy T., Yamasaki S., Chaisri U., Tongtawe P., Eampokalarp B., Tapchaisri P., Sakolvaree Y., Kurazono H., Thein W.B., Hayashi H., Takeda Y. Chaicumpa W., 2004.
Genotypes and phenotypes of Shiga toxin producing- *Escherichia coli* isolated from healthy cattle in Thailand.
J. Infection **48:**149-160.

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:**2650-2653.

Paton A.W., Paton J.C., Goldwater P.N., Heuzenroeder M.W., Manning P.A., 1993.
Sequence of a variant shiga-like toxin type-I operon of Escherichia coli O111:H$^-$.
Gene **129:**87-92.

Paton A.W., Beutin L., Paton J. C., 1995.
Heterogeneity of the amino acid sequences of *Escherichia coli* shiga-like toxin type-I operons.
Gene **153:**71-74.

Paton A.W., Srimanote P., Woodrow M.C., Paton J.C., 2001.
Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for.
Infect. Immun. **69:**6999-7009.

Paton J.C., Paton A.W., 1998.
Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections.
Clin. Microbiol. **11:**450-479.

Peacock E., Jacob V.W., Fallone S.M., 2001.
Escherichia coli O157:H7: etiology, clinical features, complications, and treatment.
Nephrol. Nurs. J. **28:**547-550, 553-555.

Piérard D., Muyldermans G., Moriau L., Stevens D., Lauwers S., 1998.
Identification of new verocytotoxin typ 2 variant b-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates.
J. Clin. Microbiol. **36:**3317-3322.

Pirro F., Wieler L.H., Failing K., Bauerfeind R., Baljer G., 1995.
Neutralizing antibodies against shiga-like toxin from *Escherichia coli* in colostra and sera of cattle.
Vet. Microbiol. **43:**131-141.

Plunkett G., Rose D.J., Durfee T.J., Blattner F.R., 1999.
Shiga toxin II phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product.
J. Bacteriol. **181:**1767-1778.

Pohl P., Cleenwerck I., Imberechts H., Jacquemin E., Marin M., China B., Mainil J., 1997.
Différences entre les pathotypes et les sérogroupes des *Escherichia coli* vérotoxinogénes isolées de veaux sains et celles isolées de veaux souffrant de diarrhée.
Ann. Méd. Vét. **141:**155-159.

Primose S.B., Wardlaw A.C., 1982.
Sourcebook of Experiments for the Teaching of Microbiology.
Academic Press, London pp. 11-12.

Ramachandran V., Hornitzky M.A., Bettelheim K.A., Walker M.J., Djordjevic S.P., 2001.
The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type.
J. Clin. Microbiol. **39:**1932-1937.

Reischl U., Youssef M.T., Kilwinski J., Lehn N., Zhang W.L., Karch H., Strockbine N.A., 2002.
Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. **40:**2555-2565.

Renter D.G., Checkley S.L., Campell J., King R., 2004.
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the faeces of Alberta feedlot cattle.
Can. J. Vet. Research **68:**150-153.

Rey J., Blanco J.E., Blanco M., Mora A., Dahbi G., Alonso J.M., Hermoso M., Hermoso J., Alonso M.P., Usera M.A., Gonzalez E.A., Bernardez M.I., Blanco J., 2003.
Serotypes, phage types and virulence genes of shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain.
Vet. Microbiol. **94:**47-56.

Robert Koch Institut (RKI), 1999.
Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC).
Epidemiologisches Bulletin **31:**227-230.

Rogerie F., Marecat A., Gambade S., Dupond F., Beaubois P., Lange M., 2001.
Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle.
Int. J. Food Microbiol. **63:**217-223.

Scheutz F., Beutin L., Pierard D., Smith H.R., 2001.
Nomenclature of Verocytotoxins. In Verocytotoxigenic Escherichia coli ed. Duffy G., Garvey P., McDowell D.A.
Trumbull, CT: Food & Nutrition Press, pp. 447-452.

Schmidt H., Russmann H., Schwarzkopf A., Aleksic S., Hessemann J., Karch H., 1994.
Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls.
Zentralbl. Bakt. **281:**201-213.

Schmidt H., Beutin L., Karch H., 1995.
Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933.
Infect. Immun. **66:**1055-1061.

Schoonderwoerd M., Clarke R.C., Van Dreumel A.A., Rawluk S.A., 1988.
Colitis in Calves: natural and experimental infection with an verotoxin producing strain of *Escherichia coli* O111:NM.
Canadian J. Vet. Research **52:**484-497.

Strockbine N.A., Jackson M.P., Sung L.M., Holmes R.K., O´Brien A.D., 1988.
Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1.
J. Bacteriol. **170:**1116-1122.

Tarr P.I., Bilge S.S., Vary J.C. Jr, Jelacic S., Habeeb R.L., Ward T.R., Baylor M.R., Besser T.E., 2000.
Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure.
Infect. Immun. **68:**1400-1407.

Urdahl A.M., Beutin L., Skjerve E., Wasteson Y., 2002.
Serotypes and virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy Norwegian sheep.
J. Appl. Microbiol. **93:**1026-1033.

Urdahl A.M., Beutin L., Skjerve E., Zimmermann S., Wasteson Y., 2003.
Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm.
J. Appl. Microbiol. **95:**92-101.

Waddell T., Head S., Petric M., Cohen A., Lingwood C., 1988.
Globotriaosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2
Biochem. Biophys. Res. Commun. **152:**674-679.

Watanabe H., Wada A., Inagaki Y., Itoh K., Tambura K., 1996.
Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different

genotype strains Japan 1996.
Lancet **348:**831-832.

Weinstein D.L., Jackson M.P., Samuel J.E., Holmes R.K., O´Brien A.D., 1988.
Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type 2 variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine.
J. Bacteriol. **170:**4223-4230.

Wieler L.H., Bauerfeind R., Baljer G., 1992.
Characterization of Shigalike toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea.
Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parsitol. Infect. Dis. **276:**243-253.

Wieler L.H., Vieler E., Erpenstein C., Schlapp T., Steinruck H., Bauerfeind R., Byomi A., Baljer G., 1996.
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes.
J. Clin. Microbiol. **34:**2980-2984.

Wieler L.H., Schwanitz A., Vieler E., Busse B., Steinrück H., Kaper J.B., Baljer G., 1998.
Virulence Properties of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) Strains of Serogroup O118, a Major Group of STEC Pathogens in Calves.
J. Clin. Microbiol., pp. 1604-1607.

Wiss R., Klare B., 1987.
Aktuelle Gesichtspunkte zur Pathophysiologie des Hämolytisch-Urämischen Syndroms
In: Balzer E., Bulla M., Kleinberg G., Zweymüller E. (Hrsg.), Akutes Nierenversagen im Kindesalter.
Schattauer Verlag Stuttgart, p. 121.

Zhang W.L., Bielaszewska M., Kuczius P., Karch H., 2002a.
Identification, characterization and distribution of a shiga toxin 1 gene variant (stx_{1c}) in *Escherichia coli* strains isolated from humans.
J. Clin. Microbiol. **40:**441-1446.

Zhang W.L., Köhler B., Oswald E., Beutin L., Karch H., Morabito S., Caprioli A., Suerbaum S., Schmidt H., 2002b.
Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strain.
J. Clin. Microbiol. **40:**4486-4492.

Zschöck M., Hamann H.P., Kloppert B., Wolter W., 2000.
Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties.
Lett. Appl. Microbiol. **31:**203-208.

Zweifel C., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Stephan R., 2004.
Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland.
Int. J. Food Microbiol. **95:**19-27.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Art.-Nr.	Artikelnummer
bp	Basenpaare
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DAH	Dachau
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
dk	doppelt konzentriert
DLG	Dillingen a. d. Donau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleoside-Triphosphat
DON	Donau-Ries
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
eae	*Escherichia coli attaching and effacing*
ED	Erding
EHEC	Enterohaemorragische *Escherichia coli*
EHEC-*hly*	Enterohaemorragische *Escherichia coli* Hämolysin
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
EPEC	Enteropathogene *E. coli*
espP	Serin-Protease
FFB	Fürstenfeldbruck
FL	Fluoreszein
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
g	Erdanziehung

Gb3	Globotriaosyl-Ceramid
Gb4	Globotetraosyl-Ceramid
GC	Guanosin-Cytidin
GLISA	Gold Labelled Immuno Sorbant Assay
HC	Haemorrhagische Colitis
HUS	Haemolytisches Urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz
iha	IrgA homologue adhesin
KbE	Koloniebildende Einheiten
konz.	konzentriert
LC	LightCycler
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LS	Längenstandard
M	München
MgCl	Magnesiumchlorid
mTSB	modifizierte Trypton-Soja-Bouillon
MVO	Milchverordnung
n.t.	nicht typisierbar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
PCR	Polymerase-chain-reaction
RiLac	Ringer Lacton
RKI	Robert Koch Institut
saa	STEC autoagglutinating adhesin
SLT	Shiga-like-toxin
SLTEC	Shiga-like-toxin-bildende *Escherichia coli*
SMAC	Sorbitol-McConkey Agar
spp.	Subspezies
ST	Shigatoxin
STEC	Shigatoxinogene *E. coli*
Stx	Shigatoxin
Stx1	Shigatoxin 1

Stx2	Shigatoxin 2
Tab.	Tabelle
TÖL	Bad Tölz-Wolfratshausen
TTP	Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura
U	units
UV	Ultra Violett
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxinbildende *Escherichia coli*
WM	Weilheim-Schongau

10 Anhang

Tab. 11: PCR-Ergebnisse der *stx*-positiven Fäzesproben

Proben Nr.	Betrieb	PCR Lin3; Lin5	PCR MK1; MK2	PCR *stx1*	PCR *stx2*	PCR *stx1c*	PCR *stx1d*	Light Cycler *stx1**	Light Cycler *stx2*
1	24	+	+	+	neg	+	neg	*"stx1";stx1c*	neg
2	24	neg	+	+	neg	+	neg	*"stx1";stx1c*	neg
3	24	+	+	+	+	+	neg	*"stx1";stx1c*	*stx2*
7	34	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
8	34	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
9	34	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
10	34	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
11	34	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
13	19	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
14	19	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
18	28	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
19	28	neg	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
20	28	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
21	28	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
24	27	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
25	27	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
27	4	+	neg	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
31	4	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
32	4	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
36	4	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
37	6	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
38	6	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
40	7	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
41	7	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
42	7	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
43	35	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
44	35	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
45	35	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
47	10	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
50	10	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
52	33	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
54	33	neg	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
55	33	neg	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
56	37	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*

Tab. 11: Fortsetzung

Proben Nr.	**Betrieb**	**PCR Lin3; Lin5**	**PCR MK1; MK2**	**PCR *stx1***	**PCR *stx2***	**PCR *stx1c***	**PCR *stx1d***	**Light Cycler *stx1****	**Light Cycler *stx2***
58	37	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
59	37	+	+	+	+	+	neg	*stx1c*	*stx2*
60	37	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
61	30	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
62	30	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
63	30	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
64	14	neg	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
65	14	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
69	14	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
70	14	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
73	25	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
75	25	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
76	25	+	+	neg	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
77	16	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
79	16	+	+	+	+	+	neg	*"stx1";stx1c*	*stx2*
80	16	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
83	16	+	+	neg	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
84	16	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
85	16	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
95	32	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
97	3	+	+	+	neg	+	+	*stx1c;stx1d*	neg
98	3	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
99	3	neg	neg	+	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
100	8	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
104	8	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
105	31	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
110	26	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
115	9	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
118	2	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
119	2	+	neg	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
121	2	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
122	2	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
124	2	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
125	2	neg	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
127	11	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
129	11	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
130	11	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*

Tab. 11: Fortsetzung

Proben Nr.	**Betrieb**	**PCR Lin3; Lin5**	**PCR MK1; MK2**	**PCR *stx1***	**PCR *stx2***	**PCR *stx1c***	**PCR *stx1d***	**Light Cycler *stx1****	**Light Cycler *stx2***
131	11	neg	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
139	12	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
140	12	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
141	12	+	+	+	neg	+	neg	*stx1c*	neg
143	12	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
145	1	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
146	1	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
147	1	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
154	36	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
161	36	+	+	+	+	+	neg	*stx1c*	*stx2*
163	38	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
167	38	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
168	23	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
170	23	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
173	22	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
176	22	+	+	+	+	+	neg	*stx1c*	*stx2*
178	13	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
180	13	neg	neg	+	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
181	13	neg	neg	neg	neg	neg	+	*stx1c*	neg
182	13	+	+	neg	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
184	13	neg	+	neg	+	neg	neg	*stx1c*	*stx2*
185	13	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
186	13	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
187	13	neg	neg	neg	neg	neg	+	*stx1d*	neg
188	5	+	+	+	neg	neg	neg	*stx1c*	neg
190	5	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
191	5	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
192	5	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
200	17	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
202	17	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
205	17	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
207	17	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
209	20	+	+	+	+	neg	+	*"stx1";stx1d*	*stx2*
210	20	+	+	+	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
211	20	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
212	20	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
213	20	neg	neg	neg	neg	neg	+	*stx1d*	neg

Tab. 11: Fortsetzung

Proben Nr.	Betrieb	PCR Lin3; Lin5	PCR MK1; MK2	PCR *stx1*	PCR *stx2*	PCR *stx1c*	PCR *stx1d*	Light Cycler *stx1**	Light Cycler *stx2*
214	20	+	+	neg	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
215	20	+	+	+	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
216	20	neg	neg	+	neg	neg	+	*stx1d*	neg
218	20	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
219	15	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
221	15	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
223	15	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
225	15	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
227	29	+	+	neg	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
230	29	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
231	29	neg	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
233	29	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
234	29	neg	+	+	neg	neg	+	*"stx1";stx1d*	neg
235	29	neg	+	neg	+	neg	+	*stx1d*	*stx2*
236	29	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
237	21	+	+	+	+	neg	neg	*"stx1"*	*stx2*
243	21	+	+	neg	+	neg	neg	neg	*stx2*
244	21	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg
250	21	+	+	+	neg	neg	neg	*"stx1"*	neg

*: *"stx1"* = *stx1*-Prototyp

Tab. 12: Bestandsübersicht

Betrieb	Landkreis	Bestand (Kühe)	Haltung	Anzahl Proben	negative Proben	Positive Proben
1	DON	60	Laufstall	8	5	3
2	DON	80	Laufstall	10	4	6
3	DON	15	Anbindehaltung	3	0	3
4	DLG	80	Laufstall	10	6	4
5	ED	100	Laufstall	10	6	4*
6	DON	10	Anbindehaltung	3	1	2
7	DON	18	Anbindehaltung	3	0	3
8	DON	33	Anbindehaltung	5	3	2
9	DON	12	Anbindehaltung	3	2	1
10	DLG	35	Anbindehaltung	5	3	2
11	DLG	100	Laufstall	10	6	4
12	DON	65	Laufstall	8	4	4
13	FFB	100	Laufstall	10	2	8**

Tab. 12: Fortsetzung

Betrieb	Landkreis	Größe (Kühe)	Haltung	Anzahl Proben	negative Proben	Positive Proben
14	DLG	60	Laufstall	8	4	4
15	WM	60	Anbindehaltung	8	4	4
16	DON	90	Laufstall	10	4	6
17	TÖL	80	Laufstall	10	6	4
18	DON	25	Anbindehaltung	5	5	0
19	DON	34	Anbindehaltung	5	3	2
20	TÖL	70	Anbindehaltung	10	1	9
21	M	150	Laufstall	16	12	4
22	FFB	30	Anbindehaltung	5	3	2
23	DAH	40	Anbindehaltung	5	3	2
24	DON	4	Weide	3	0	3
25	DON	32	Anbindehaltung	5	2	3
26	DLG	47	Laufstall	5	4	1
27	DLG	38	Anbindehaltung	5	3	2
28	DON	31	Anbindehaltung	5	1	4
29	WM	75	Laufstall	10	3	7
30	DON	14	Anbindehaltung	3	0	3
31	DON	9	Anbindehaltung	3	2	1
32	DON	27	Anbindehaltung	5	4	1
33	DLG	32	Anbindehaltung	5	2	3
34	DON	23	Anbindehaltung	5	0	5
35	DLG	14	Anbindehaltung	3	0	3
36	DAH	90	Laufstall	10	8	2
37	DON	24	Anbindehaltung	5	1	4
38	DAH	35	Anbindehaltung	5	3	2

*: eine Probe nicht eindeutig bestätitgt
**: zwei Proben nicht eindeutig bestätitgt

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Erwin Märtlbauer, Leiter des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. Ulrich Busch, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim, und den Mitarbeitern des EHEC-Labors danke ich für die freundliche Aufnahme und die Einführung in die Technik des Kolonieblots.

Herrn Dr. habil. Gallien und den Mitarbeitern des Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin, danke ich für die unverzügliche Serotypisierung der Isolate.

Besonderes danken möchte ich Frau Dr. Christine Bürk für ihre stets gewährte Unterstützung in allen fachlichen Belangen und ihrer unermüdlichen Geduld bei der Korrektur der Entwürfe.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Technologie der Milch, vor allem Frau Susanne Eberhardt und deren Kollegen des Mikrobiologischen Labors, die mich mit viel Engagement und großer Hilfsbereitschaft in die verschiedensten Arbeitstechniken eingeführt haben und mich fachlich bei den durchgeführten Untersuchungen hervorragend unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich noch bei meinen Eltern Magdalena und Xaver Mayrshofer bedanken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht und mich moralisch und finanziell unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Annabelle Mayrshofer bedanken, die mir mit Rat und Tat und vielen aufmunternden Worten beim Fortgang meiner Arbeit zur Seite stand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Xaver Mayrshofer
Geburtsdatum	04.12.1975
Geburtsort	Donauwörth
Eltern	Magdalena und Xaver Mayrshofer
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

09.1982 – 07.1986	Grundschule Tapfheim
09.1986 – 07.1990	Gymnasium Bonaventura Dillingen
09.1990 – 06.1995	Gymnasium St. Stefan in Augsburg
30. Juni 1995	Abitur

Wehrdienst

07.1995 – 10.1996	Zivildienst im Regens Wagner Institut Dillingen

Hochschulstudium

11.1996 – 12.2001	Veterinärmedizinisches Studium an der LMU München
18. Januar 2002	Approbation
01. Juli 2003	Begin der Promotion

Berufstätigkeit

02.2002 – 12.2004	Tierarzt in Gemischtpraxis in Tapfheim (Dr. Gruber)
seit 01. Januar 2005	Gebietsleiter bei PIG-Süd Vertriebs-GmbH